UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Mecanismos de regulação epigenética e heterogeneidade
tumoral clonal em melanoma metastático humano envolvendo
gene RECK**

Manoela Tiago dos Santos

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Mecanismos de regulação epigenética e heterogeneidade
tumoral clonal em melanoma metastático humano envolvendo
gene RECK**

Manoela Tiago dos Santos

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Manoela Tiago dos
S237m Mecanismos de regulação epigenética e heterogeneidade tumoral
 clonal em melanoma metastático humano envolvendo gene
 RECK / Manoela Tiago dos Santos. -- São Paulo, 2015.
 142p

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi

1. Neoplasmas malignos 2. Biologia molecular 3. Biologia
celular I. T. II. Maria-Engler, Silvy Stuchi, orientador.

616.994 CDD

Manoela Tiago dos Santos

**Mecanismos de regulação epigenética e heterogeneidade tumoral clonal em
melanoma metastático humano envolvendo gene RECK**

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

Orientadora/Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2015.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Pós-Graduação

Agradecemos a sua participação na banca avaliadora, e solicitamos que assinale um dos itens abaixo:

- (☒) A banca recomenda a entrega de uma **Versão Corrigida**, com aval do Orientador;
- (☐) A banca considera a **Versão Original** adequada para ser encaminhada para a Biblioteca Digital da USP.

Comentários que julgar pertinentes:

A candidata deve fazer inclusão de informações em material
e métodos (lista de pacientes e obtenção dos amostras) tem como excluir
dados pouco informativos e redundantes. Deve incluir discussão aprofundada e
estruturada incluir todos os detalhes discutidos pela banca.

Nome do Aluno: **Manoela Tiago dos Santos**

Ciência do Orientador (Presidente):

Prof(a). Dr(a). Silvyia Stuchi Maria Engler
Farmácia – Área: Análises Clínicas

Data: 14/12/2015

*Ao meu Senhor Jesus, que me sustentou
inumeráveis vezes e me concedeu a benção de
percorrer este caminho.*

*Aos meus pais, Wilson e Adriana, pelo amor
incondicional e pela certeza de que não estou
sozinha nesta jornada.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por me guiar, me sustentar e me ensinar que eu realmente posso tudo em Ti, que me fortalece. Muito obrigada por mais este milagre!

Aos meus pais, Wilson e Adriana, pelo amor, exemplo de vida, cuidado e comprometimento em todos os momentos. Às minhas irmãs Luciana e Fabiana, ao meu cunhado Reinaldo e aos meus sobrinhos Nicollas, Ingrid e Melissa, minhas alegrias. Amo vocês!

À minha orientadora, Profa. Silvy Stuchi, pelo exemplo, orientação e liderança. Muito obrigada por ter me dado a oportunidade de trabalhar ao seu lado e fazer parte da sua história. Muito obrigada pelo incentivo do estágio no exterior. Não tenho palavras para agradecer o quanto aprendi com a senhora nesses 7 anos. Muito obrigada pela confiança, incentivo, paciência, conselhos, disposição e críticas construtivas. Muito obrigada por me apoiar no momento mais difícil da minha vida e por chorar comigo. Esses momentos de empatia e carinho foram muito valiosos para mim! Desejo a senhora muito sucesso em suas pesquisas e espero que, mesmo depois deste trabalho, nosso relacionamento continue por muitos anos!

À minha “co-orientadora”, Profa. Silvia Berlanga, pelos inúmeros conselhos. A senhora me orientou e se preocupou comigo como se eu fosse sua orientanda e, muitas vezes, um ente querido. A senhora é um exemplo de vida para mim!

Ao meu orientador do estágio no exterior, Professor Keiran Smalley, pela orientação e suporte científico e financeiro durante meu doutorado sanduíche. Aos meus amigos e colegas do Moffitt Cancer Center, Vito, Gretchen, Sebastian, Inna, Manali, Marilena, Noemi, Kim e Erik, pelo auxílio, treinamento e acolhimento. Meus dias em Tampa foram inesquecíveis! À Jodie e à Johana, funcionárias do FACS, pelo auxílio na realização dos ensaios de citometria.

Aos meus parceiros de laboratório da Citopato, pelos momentos de descontração e discussão de resultados. Eu amo conviver com vocês, o melhor lab. do mundo!!! Agradeço a Bibi, Paula, Michelle, Thata, Raquelzinha, Debs, Sil Sandri, Fer Faião, Sil Romano, Carol, Érica, Nayane, Tati Pedrosa, Kely, Renato, Camila e aos ICs Taissa, Gabi, Octávio e Gustavo. Agradeço especialmente à Paula, que realizou o ensaio de invasão de melanoma em pele reconstruída; à Fernanda, pelo ensaio de marcadores de pluripotência por Stem Cell-ness Array; e à Taissa, minha aluna de iniciação científica.

Aos meus amigos da Igreja Batista em Vila das Belezas, especialmente Damares e Fernando, Jane e Anderson, Priscila e Gleidson, Helen e Ivan, Nice e Daniel, Fabi e Léo, Lilian e Douglas, Michele e Sandro e Pr. Israel e Rosa. Às minhas amigas de infância, Daniela e Patrícia. Às minhas amigas da faculdade, Fabi, Alessandrinha, Ni, Paty, Bru, Estelinha e Renatinha. Aos meus amigos do Seminário Teológico Mizpá, da UNONEX e da First Baptist Church in Temple Terrace. Obrigada pelo suporte, orações, incentivo e carinho.

À Profa. Ana Campa e aos meus amigos e parceiros Silene e Edson, pelo empréstimo de reagentes e discussão de resultados.

À Renatinha, funcionária responsável pelo FACS, pelo auxílio na realização dos ensaios no citômetro e pelo suporte científico no ensaio de CSFE.

Ao laboratório dos Profs. Mário Hirata e Rosário Hirata, pelo uso e auxílio na manipulação dos equipamentos e discussão de ensaios de Real Time PCR.

À Profa. Ana Krepischi, IB-USP, por ceder cDNAs de amostras de pacientes para ampliação do painel de expressão gênica basal de RECK e por tirar algumas dúvidas quanto a expressão epigenética.

À Profa. Miriam G. Jasiulionis, Departamento de Farmacologia – UNIFESP, pelo empréstimo de 5-aza-dC e TSA e pelo auxílio nas dúvidas referentes à análise de expressão epigenética.

Aos funcionários da FCF, especialmente às secretárias Ana, Sueli, Dora, Edna e Marilisa, e às funcionárias Claudinha e Rose, pelos serviços prestados e conversas. Às funcionárias da limpeza, por todos os serviços prestados.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pelo auxílio técnico e financeiro.

À FAPESP (Processos de doutorado 2011/19045-9 e doutorado sanduíche 2012/05910-2, e Processo Regular de Pesquisa 2010/15919-1) e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À Universidade de São Paulo, pelo suporte técnico, acadêmico e financeiro.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese de doutorado.

PREFÁCIO

Esta tese é composta de dois capítulos, cujas abordagens discutem a expressão de RECK em melanoma metastático humano.

O Capítulo 1 corresponde à proposta inicial do projeto de doutorado, que visou avaliar a hipermetilação no promotor gênico de RECK em linhagens de melanoma metastático humano, a fim de reverter o fenótipo invasivo das culturas utilizadas. Todavia, nossos dados mostraram que, embora a metilação do promotor seja responsável pelo controle da expressão gênica em RECK, a remoção das marcas epigenéticas ligadas ao silenciamento gênico não foram capazes de resgatar a função antitumoral desse gene. Além disso, a superexpressão do gene RECK não se mostrou eficiente nas linhagens de melanoma humano analisadas e o silenciamento em células normais, os melanócitos, não demonstrou perfil relevante.

O Capítulo 2 corresponde aos resultados obtidos durante o período de doutorado sanduíche iniciado nos Estados Unidos, sob orientação do Prof. Dr. Keiran S. Smalley (Moffitt Cancer Center, Tampa, FL, EUA) e finalizado no Brasil. Os dados gerados mostraram uma correlação entre proliferação, invasividade e resistência à morte celular induzida pelo inibidor de BRAF vemurafenibe em subpopulações clonais, obtidas a partir de uma população de células de melanoma parental (naïve). Dentre os parâmetros analisados alguns fenômenos observados nas células subclonais se mostraram semelhantes àqueles observados em células de melanoma resistentes ao inibidor de BRAF. Discutimos, portanto, se a seleção estocástica de clones tumorais a partir de uma linhagem de células tumorais seria promissora para predizer subpopulações quimiorresistentes presentes nas população parental (naïve), fazendo um paralelo em relação à heterogeneidade presente no tumor inicial do paciente.

Através destes estudos, esperamos contribuir para a discussão sobre a participação de supressores tumorais como RECK em mecanismos de progressão tumoral, seleção tumoral clonal e resistência a inibidores de tirosina quinase, como vemurafenibe.

RESUMO

SANTOS, M. T. **Mecanismos de regulação epigenética e heterogeneidade tumoral clonal em melanoma metastático humano envolvendo gene RECK**. 2015. 130p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os pacientes com melanomas, em geral, apresentam extrema quimiorresistência e prognóstico ruim, com taxa de sobrevida de aproximadamente seis meses; portanto, novas estratégias terapêuticas são necessárias. As células deste tipo de tumor acumulam alterações na expressão gênica que contribuem para a proliferação descontrolada, evasão de senescência e inibição de morte celular em múltiplas rotas intracelulares. No Capítulo 1, foi explorado o controle epigenético do supressor tumoral RECK. Esse gene é largamente expresso em tecidos normais, com correlação de sua expressão com melhor prognóstico. Em tumores, RECK é inibido, incluindo em melanoma. Neste estudo, sua inibição por hipermetilação do promotor e remodelamento da cromatina por HDACs não foi o único fator inibitório nas linhagens de melanoma analisadas. Mesmo após a utilização a remoção de marcas epigenéticas associadas ao silenciamento gênico, a expressão proteica não pôde ser recuperada nas linhagens utilizadas neste trabalho. No Capítulo 2, isolou-se subpopulações clonais ao acaso a fim de modelar a heterogeneidade tumoral intrínseca. Neste modelo experimental, caracterizamos a presença de dois perfis tumorais subclonais: uma mais proliferativa, invasiva e sensível a vemurafenibe; e outra menos proliferativa, mais resistente e com maior expressão de RECK e fatores ligados a EMT. Nossos resultados, em conjunto, mostraram que as linhagens celulares parentais utilizadas apresentam diferenças entre si quanto à viabilidade celular, indução de apoptose e fosforilação de ERK após o tratamento com vemurafenibe. Segundo o nosso modelo, a resistência intrínseca ao vemurafenibe está presente e reflete a heterogeneidade do tumor inicial. Com estes resultados, pretendemos contribuir para o conhecimento sobre a composição clonal presente na heterogeneidade tumoral, além de contribuir para a função de RECK na biologia do melanoma.

Palavras-chave: RECK. Expressão gênica. Heterogeneidade tumoral clonal. Invasão. Resistência a vemurafenibe. Melanoma.

ABSTRACT

SANTOS, M. T. **Mechanisms of epigenetic regulation and tumor clonal heterogeneity in human metastatic melanoma involving RECK gene.** 2015. 130p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Patients with melanoma often present extreme chemoresistance and poor prognosis, with survival rates of approximately six months; therefore, new therapeutic strategies are necessary. Melanoma cells accumulate genotypic changes that contribute to uncontrolled proliferation, evasion of senescence and cell death inhibition in multiple cellular pathways. In Chapter 1, we have explored the epigenetic control of the tumor suppressor RECK. This gene is widely expressed in normal tissues, with correlation of its expression with better prognosis. In tumors, RECK is inhibited, including melanoma. Here, RECK inhibition by promoter hypermethylation and chromatin remodeling by HDACs was not the only inhibiting factor in the melanoma cell lines analyzed. Even after removing the epigenetic marks associated to gene expression silencing, the protein expression could not be recovered in the cell lines used in this study. In Chapter 2, it has been isolated several tumor clonal subpopulations in order to modulate the intrinsic tumor heterogeneity. In this experimental model, we have characterized the presence of two tumor subclonal profiles: a more proliferative, invasive and sensitive to Vemurafenib; and other less proliferative, less sensitive to Vemurafenib and presenting more expression of RECK and factors associated to EMT. Our results together have showed the parental cell lines used here differed from each other in terms of cell viability, induction of apoptosis, and ERK phosphorylation after treatment with Vemurafenib. According to our model, the intrinsic resistance to Vemurafenib is present and reflects the heterogeneity of the initial tumor. With these results, we intend to contribute to the knowledge of the tumor clonal subpopulations composition in tumor heterogeneity, and contributes to the RECK function in melanoma biology.

Keywords: RECK. Gene expression. Tumor clonal heterogeneity. Invasion. Resistance to Vemurafenib. Melanoma.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	4
REVISÃO DA LITERATURA: Panorama do melanoma.....	8
CAPÍTULO 1.....	16
1. INTRODUÇÃO: Expressão de RECK em tumores	17
2. OBJETIVO GERAL	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Linhagens celulares.....	21
3.2. Análise de expressão gênica através PCR em tempo real.....	24
3.3. Análise de expressão proteica por Western Blot	25
3.4. Remoção de marcas epigenéticas associadas ao silenciamento gênico pelo tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina e trichostatina A	27
3.5. Quantificação proteica de RECK por citometria de fluxo	27
3.6. Inibição de RECK em células normais de melanócitos normais humanos.....	28
3.7. Superexpressão de RECK em linhagens celulares de melanoma metastático humano.....	30
3.8. Análise da eficiência de infecção lentiviral por citometria de fluxo	34
3.9. Curva de crescimento por exclusão de Azul de Tripán	34
3.10. Análise estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	35
4.1. Expressão basal de RECK em melanoma metastático humano.....	35
4.2. Remoção das marcas epigenéticas associadas ao silenciamento gênico através do uso de agentes desmetilantes globais do DNA e inibidores da desacetilação de histonas	38
4.3. Superexpressão de RECK em linhagens celulares de melanoma metastático humano.....	41
4.4. Inibição da expressão de RECK em melanócitos normais humanos	44
5. DISCUSSÃO	50

6. CONCLUSÃO	53
CAPÍTULO 2.....	54
1. INTRODUÇÃO: Heterogeneidade tumoral clonal em melanoma	55
2. OBJETIVO GERAL	59
3. MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1. Linhagens tumorais	59
3.2. Isolamento de subpopulações clonais de melanoma a partir de linhagens parentais	59
3.3. Identificação da linhagem celular original por short tandem repeat (STR).....	61
3.4. Tratamento com vemurafenibe	61
3.5. Curva de crescimento e viabilidade celular pelo ensaio de MTT	61
3.6. Proliferação celular pelo ensaio de Cell Track™ CSFE Kit.....	62
3.7. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo	62
3.8. Senescência celular por coloração com β -galactosidade	62
3.9. Ensaio de migração celular por “ferida”	63
3.10. Expressão gênica por Real Time PCR	63
3.11. Expressão proteica por Western Blot.....	63
3.12. Avaliação da sobrevivência celular por ensaio clonogênico	64
3.13. Caracterização de morte celular do tipo apoptose por citometria de fluxo....	64
3.14. Crescimento celular independente de ancoragem sobre “cama” de agarose .65	
3.15. Viabilidade celular em cultura tridimensional de esferoide tumoral tridimensional	65
3.16. Expressão de fatores de EMT por stem cell-ness array	66
3.18. Imuno-histoquímica em pele reconstruída in vitro	66
3.19. Análise estatística.....	67
4. RESULTADOS.....	67
4.1. Comprovação da heterogeneidade tumoral da população parental inicial.....	67
4.2. Sensibilidade das subpopulações de melanoma ao inibidor de BRAF vemurafenibe.....	80

4.3. Influência da heterogeneidade tumoral sobre a capacidade de invasão de células de melanoma na presença de vemurafenibe.....	88
5. DISCUSSÃO	94
5.1. Heterogeneidade intrínseca do melanoma	94
5.2. A sensibilidade a vemurafenibe reflete a heterogeneidade tumoral do melanoma	96
5.3. A resistência a vemurafenibe está atrelada a maior EMT nas subpopulações clonais	98
6. CONCLUSÃO	99
BIBLIOGRAFIA	101
ANEXO I	115
A) Preparo das amostras para sequenciamento.....	116
1. Digestão enzimática dos vetores de expressão utilizados para transfecção, descritos no Capítulo 1	116
B) Diferenças entre os protocolos utilizados para superexpressão de RECK através de infecção lentiviral.....	120
.....	120
ANEXO II.....	121
A) Expressão de LC3B na linhagem tumoral WM164.....	122
B) Ensaios realizados com a linhagem tumoral A375.....	123
ANEXO OBRIGATÓRIO	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Terapias para melanoma metastático humano.....	9
Figura 2. Terapias direcionadas a alvos moleculares para o tratamento do melanoma.....	11
Figura 3. Mecanismos de aquisição de resistência a BRAFi	13
Figura 4. Inibição de metaloproteínas via proteína RECK.....	18
Figura 5. Mapa do vetor pLKO.1 puro, utilizado para o silenciamento de <i>RECK</i> em melanócitos e fibroblastos.	29
Figura 6. Sequências shRNA para <i>RECK</i> que inibem diferentes regiões do transcrito.....	29
Figura 7. Mapa do vetor pCXN2, utilizado para a superexpressão de <i>RECK</i> em linhagens de melanoma metastático humano.....	31
Figura 8. Mapa do vetor FG12, utilizado para a superexpressão de <i>RECK</i> em linhagens de melanoma metastático humano	32
Figura 9. Morfologia das linhagens celulares utilizadas para avaliação da expressão basal de <i>RECK</i> . Foram utilizadas linhagens de melanoma metastático humano comparadas com culturas primárias de melanócitos e fibroblastos normais humanos	35
Figura 10. Expressão gênica relativa de <i>RECK</i> por PCR em tempo real para linhagens de melanoma metastático e culturas primárias de melanócitos e fibroblastos normais humanos.....	36
Figura 11. Expressão gênica relativa de <i>RECK</i> por PCR em tempo real em amostras de melanoma cutâneos primários	37
Figura 12. Expressão proteica constitutiva de <i>RECK</i> nas linhagens de melanoma.....	38
Figura 13. Expressão gênica relativa de <i>RECK</i> , avaliada por PCR em tempo real, após tratamento concomitante com 5-aza e TSA por 96 horas.....	39
Figura 14. Expressão proteica de <i>RECK</i> após tratamento concomitante com 5-aza e TSA por 96 horas	40
Figura 15. Morfologia de linhagens de melanoma metastático humano SK-Mel-28 e SK-Mel-103 transfectadas com <i>RECK</i>	41
Figura 16. Expressão gênica de <i>RECK</i> nas linhagens de melanoma metastático humano SK-Mel-28 e SK-Mel-103 após a transfecção.....	42
Figura 17. Expressão proteica de <i>RECK</i> nas populações selecionadas após a transfecção	42
Figura 18. Morfologia de linhagens de melanoma metastático humano infectadas com vetor lentiviral FG12-CMV com cDNA de <i>RECK</i>	44

Figura 19. Validação do silenciamento de <i>RECK</i> nas culturas de melanócitos humanos normais infectadas com diferentes sequências de shRNA <i>RECK</i>	45
Figura 20. Morfologia das culturas de melanócitos humanos normais infectadas com diferentes sequências de shRNA <i>RECK</i>	46
Figura 21. Curva de crescimento de culturas de melanócitos humanos normais infectados com diferentes sequências de shRNA <i>RECK</i>	47
Figura 22. Microfotografia de melanócitos normais humanos infectados com diferentes sequências de shRNA <i>RECK</i>	48
Figura 23. Validação do silenciamento de <i>RECK</i> em cultura de fibroblastos humanos normais infectada com diferentes sequências de shRNA <i>RECK</i>	49
Figura 24. Curva de crescimento de fibroblastos humanos normais infectados com diferentes sequências de shRNA <i>RECK</i>	50
Figura 25. Modelos de heterogeneidade tumoral clonal.....	58
Figura 26. Isolamento estocástico de subpopulações tumorais clonais, a partir da linhagem tumoral parental.....	60
Figura 27. Morfologia celular das subpopulações clonais oriundas de melanoma metastático humano WM164 (parental)	68
Figura 28. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a (A) curva de crescimento, (B) análise do ciclo celular por 72h, (C) proliferação celular por 96h.....	74
Figura 29. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a expressão proteica de marcadores de pluripotência GATA-4, OTX-2 e Snail por 72 horas.....	76
Figura 30. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a (A) invasão celular e (H) migração celular	77
Figura 31. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a crescimento celular independente de ancoragem.....	78
Figura 32. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a expressão gênica de <i>FRA1</i>	79
Figura 33. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a (A) parada em ciclo celular e (C) expressão proteica de proteínas reguladoras do ciclo celular: ativação de pRb, CDK4 e ciclina D1.....	82
Figura 34. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a (A) ativação de ERK, (B) expressão proteica de proteínas reguladoras da via de BRAF:	

CRAF, ativação de GSK3 β e EGFR, (C) ativação de AKT e (D) sensibilidade tempo e (E) dose dependente a vemurafenibe	83
Figura 35. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a formação de colônias, pelo ensaio clonogênico	84
Figura 36. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a indução de senescência celular	85
Figura 37. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a (A) viabilidade celular em monocamada, (B) indução de apoptose e (C) expressão de proteínas anti-apoptóticas: ativação de BAD, BIM e Mc-1	86
Figura 38. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a viabilidade celular em modelo tridimensional de esferoides tumorais	87
Figura 39. Capacidade de invasão tumoral das subpopulações de melanoma WM164 quanto a (A) expressão proteica de RECK, (B) expressão gênica de REPIN1, reguladores de MMPs, e da expressão gênica de (C) MMP-1 e (D) MMP-2.....	90
Figura 40. Capacidade de invasão tumoral das subpopulações de melanoma WM164 quanto a expressão proteica de reguladores de EMT e adesão celular: N-caderina, integrina α V, Snail, FAK E STAT3.	91
Figura 41. Capacidade de invasão tumoral das subpopulações de melanoma WM164 quanto a secreção de citocinas pró-tumorais (A) IL-6 e (B) IL-8 de subpopulações em monocamada.....	92
Figura 42. Capacidade de invasão tumoral das subpopulações de melanoma WM164 em (A) modelo de pele humana reconstruída in vitro	93
Figura 43. Modelo de heterogeneidade tumoral em WM164	99
Figura 44. Digestão dos vetores com as enzimas de restrição Xho I e Hind III.....	117
Figura 45. Alinhamento das sequências geradas após o sequenciamento do vetor pCXN2 contendo RECK com o banco de dados <i>Standard Nucleotide BLAST</i> do NCBI....	118
Figura 46. Digestão dos vetores com as enzimas XhoI e EcoRI	119
Figura 47. Alinhamento das sequencias geradas após o sequenciamento do vetor FG12-CMV contendo RECK com o banco de dados <i>Standard Nucleotide BLAST</i> do NCBI	119
Figura 48. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a indução da expressão da proteína autofágica LC3B	122
Figura 49. Ensaios de caracterização da heterogeneidade tumoral clonal na linhagem parental A375.....	123

“Acima de tudo, não perca seu desejo de prosseguir.”

Søren Kierkegaard

REVISÃO DA LITERATURA: Panorama do melanoma

O câncer de pele do tipo melanoma é o tumor maligno oriundo de melanócitos transformados, que perderam a capacidade de responder à interação com queratinócitos, seus principais reguladores de proliferação celular (Haass & Herlyn 2005). Fatores genéticos, epigenéticos e etiológicos contribuem para o aparecimento do melanoma. A alta exposição à radiação solar, principalmente em indivíduos de pele e olhos claros, a presença de nevos e predisposição genética são fatores de risco para a aquisição desta neoplasia (Siegel et al. 2014).

O melanoma representa 2% de todos os diagnósticos de neoplasias malignas no mundo (GLOBOCAN 2012). Para o Brasil, foram estimados 2.960 casos em homens e 2.930 em mulheres em 2014 sendo, portanto, considerado um câncer de baixa incidência, afetando majoritariamente pessoas acima de 60 anos e indivíduos do sexo masculino (INCA 2014; Read et al. 2015). Embora seja o menos frequente dentre os tumores de pele, a incidência do melanoma aumentou 15 vezes nos últimos 40 anos (Cancer Research, UK 2015). Atualmente, o melanoma corresponde à forma mais letal de câncer de pele, com prognóstico extremamente ruim em estágios avançados e sobrevida de 5 meses na maioria dos casos (Siegel et al. 2014).

As terapias vigentes para o melanoma são cirurgia, radioterapia, imunoterapia, quimioterapia clássica e terapias dirigidas a mutações específicas (Figura 1). A cirurgia é caracterizada pela remoção do tumor e de gânglios linfáticos adjacentes a ele, a fim de aumentar a sobrevida do paciente, embora dados da literatura relatem que tal procedimento é eficaz somente nos primeiros estágios da doença (Breslow 1970; Cancer Research UK 2015). A radioterapia, que emprega feixes de radiações ionizantes no local do tumor, e a imunoterapia, que utiliza altas doses de interleucina (IL) - 2 ou interferon (IFN) alfa para ativar o sistema imune do paciente, são utilizadas como terapias adjuvantes. Estas apresentam efeitos adversos severos com melhoria do prognóstico do paciente em alguns casos (Rebecca et al. 2012; Niezgoda et al. 2015). A quimioterapia clássica, que utiliza agentes alquilantes, como a dacarbazina, é a terapia mais empregada clinicamente, embora seja pouco efetiva (eficácia de 10-20%) e apresente diversos efeitos colaterais devido a sua baixa especificidade às células tumorais (Read et al. 2015).

Dado a ineficiência das terapias mencionadas acima, houve uma busca de novas alternativas terapêuticas e atualmente vivenciamos a era das terapias direcionadas a alvos

moleculares e imunoterapia. Um esquema representativo das terapias empregadas no combate ao melanoma está apresentado na Figura 1.

Figura 1. Terapias para melanoma metastático humano. Linha do tempo dos tratamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), órgão governamental dos Estados Unidos responsável pela regulamentação de alimentos e medicamentos. A dacarbazina e altas doses de IL-2 foram os únicos agentes aprovados entre 1976 e 2011. O vemurafenibe e ipilimumabe foram aprovados em 2011 e, em 2013 aprovou-se dabrafenibe e trametinibe. Esses novos agentes foram aprovados em um período entre 12 a 18 meses, o que evidencia a rápida evolução dos tratamentos vigentes.

Fonte: Adaptado de Sullivan et al. 2013 e Niezgoda et al. 2015.

Apesar das células tumorais apresentarem imunogenicidade antigênica, diversos mecanismos impedem que essas células tumorais sejam reconhecidas e eliminadas pelo sistema imune (Hanahan & Weinberg 2011). Para isso, foram desenvolvidos anticorpos que poderiam resgatar a imunidade antitumoral latente do paciente. Iguns exemplos de imunoterapia direcionada são os anticorpos antiantígeno 4 associado a linfócito T (CTLA-4), antiproteína de morte celular programada 1 (PD-1) e antiligante do receptor da proteína de morte celular programada 1 (PDL-1) (Sullivan et al. 2013; Lejeune 2015; Niezgoda et al. 2015).

O ipilimumabe age como um anticorpo monoclonal que bloqueia os receptores CTLA-4, presentes exclusivamente em linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺, ativando, desta forma, a resposta imune no combate do melanoma, por inibição do fator de transformação do crescimento (TGF) - β e ativação de células apresentadoras de antígeno (McCoy & Le Gros 1999; Sullivan et al. 2013). Embora seja eficiente a longo prazo, ipilimumabe é tolerado somente por uma pequena parcela dos pacientes, devido a ativação adversa de autoimunidade que desencadeia diversos efeitos colaterais e fatais (Horvat et al. 2015).

Os inibidores de PD-1 e PDL-1 são o tratamento de escolha para pacientes que não respondem às outras terapias, principalmente aqueles que apresentam células resistentes não mutadas para o proto-oncogene que corresponde a quinase BRAF, membro da família RAF de quinases específicas para fosforilação em serina/treonina (Swaika et al. 2015). O nivolumabe e o pembrolizumabe são dois anticorpos antitumorais que bloqueiam o receptor de morte programada PD-1, presente em linfócitos T (Sullivan et al. 2013; Swaika et al. 2015). Já os anticorpos anti-PDL-1 bloqueiam esse receptor, o principal ligante de PD-1 e que se encontra presente na célula tumoral e nas células apresentadoras de antígeno (Philips & Atkins 2015). Tanto PD-1 quanto PDL-1 inibem o sistema imune e a ação de anti-PD-1/PDL-1 é semelhante aos anticorpos anti-CTLA-4, embora apresente poucos efeitos colaterais sem diminuição da eficácia antitumoral, se comparado a ipilimumabe (Philips & Atkins 2015; Swaika et al. 2015).

A terapia para alvos moleculares, diferentemente da imunoterapia atual, é específica para vias que são superexpressas em melanoma (Sosman et al. 2012). Após a descoberta de mutações-chave para o desenvolvimento e progressão do melanoma, foi possível o desenvolvimento de tratamentos direcionados a mutações exclusivas às células tumorais. Uma das vias mais exploradas para o desenvolvimento de terapias alvo específicas é a via do homólogo do oncogene viral RAS (RAS) associado a proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), também denominada via de RAS/MAPK (Figura 2), superexpressa em 50-60% dos pacientes com melanoma (Bollag et al. 2012; Sosman et al. 2012; Niezgoda et al. 2015). O vemurafenibe, o primeiro inibidor farmacológico específico para células que apresentam a mutação BRAF V600E (substituição de valina por ácido glutâmico) foi liberado para uso em pacientes em 2011 e, desde então, tem revolucionado a terapia antimelanoma, devido a sua fácil administração (oral), rápida resposta e efeitos colaterais não associados a quimioterapia convencional. Porém, cerca de 5 meses após o início do tratamento, os pacientes apresentam agressiva quimiorresistência e retorno dos focos tumorais (Bollag et al. 2012; Kirkwood 2012; Das Thakur et al. 2013; Niezgoda et al. 2015). O dabrafenibe tem ação semelhante ao vemurafenibe, porém apresenta maior eficácia, já que também inibe a proliferação de células que apresentam a mutação menos frequente BRAF V600K (substituição de valina por lisina) e é mais efetivo em metástases cerebrais, ocasionando um aumento da sobrevida dos pacientes para 7 meses, com menores efeitos colaterais (Carlini et al. 2013; Rizos et al. 2014; Niezgoda et al. 2015). Mesmo após a inibição da via de BRAF, já foi relatado que a mesma é capaz de ser reativada por diversos mecanismos que levam a superexpressão de MEK, quinase ativadora de MAPK e da

quinase regulada por sinal extracelular (ERK). Para isso, foram desenvolvidos inibidores de MEK, como trametinibe e cobimetinibe, que podem ser utilizados sozinhos ou concomitantemente com inibidores de mutação em BRAF, a fim de minimizar a reativação da via de BRAF/MEK/ERK (Carlino et al. 2013; Niezgoda et al. 2015).

Figura 2. Terapias direcionadas a alvos moleculares para o tratamento do melanoma. Alvos específicos da via de RAS/MAPK.

Fonte: Retirado de Niezgoda et al. 2015.

Apesar dos esforços dedicados à identificação de marcadores celulares e gênicos para combater efetivamente a progressão tumoral, a quimiorresistência é um dos grandes problemas no tratamento do melanoma, mesmo a despeito dos avanços na imunoterapia e na terapia direcionada a alvos gênicos (Gray-Schopfer et al. 2007; Carlino et al. 2013;

Niezgoda et al. 2015). Embora anticorpos específicos para CTLA-4, PD-1/PDL-1 e inibidores de BRAF (BRAFi) tenham melhorado muito a sobrevida do paciente, a média de vida de indivíduos com metástases disseminadas e inoperáveis ainda é inferior a 10 meses (Melnikova & Bar-Eli 2009; Kirkwood 2012; Niezgoda et al. 2015). Essa rápida evolução tumoral e metástase do melanoma é favorecida por diversos mecanismos de quimiorresistência (Soengas & Lowe 2003; Ossowski & Aguirre-Ghiso 2010; Kemper et al. 2015).

As células tumorais acumulam uma série de alterações genotípicas que favorecem a proliferação descontrolada, evasão de senescência, invasão celular e inibição de morte por modulação de múltiplas rotas intracelulares (Soengas & Lowe 2003; Haass & Herlyn 2005; Chapman et al. 2013). Uma das rotas que mais contribui para a aquisição de quimiorresistência é via de RAS/RAF/MEK/ERK, que regula a sobrevivência e proliferação celular e induz a ativação constitutiva de ERK em até 90% dos melanomas humanos (Goydos et al. 2005; Lito et al. 2013). A frequência de mutações com ganho de função em NRAS (homólogo de RAS em neuroblastoma) e BRAF (preferencialmente a mutação V600E), é de 15 a 30% e 50 a 70% nos pacientes com melanoma, respectivamente (Goydos et al. 2005; Poynter et al. 2006). A mutação BRAF V600E é muito importante no processo de progressão tumoral, pois pode estimular angiogênese, supressão de fatores de transcrição associado a microftalmia (MITF) e regulação do ciclo celular por ciclina D1 e do inibidor de quinases dependente de ciclina p16 (p16/INK4A) (Hanahan & Weinberg 2011; Carlino et al. 2013; Kim et al. 2013; Wellbrock & Arozarena 2015). A coativação entre receptores de tirosina quinases (RTKs), ou seja, a ativação de dois ou mais RTKs, e o “*crosstalk*” entre elas também auxilia na ativação constitutiva da via de RAS/MAPK (Carlino et al. 2013; Bollag et al. 2010). Já foi relatada que a coestimulação de receptores de TGF- β , fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e IL-6 associada a Janus quinases (JAK), ou seja, IL-6/JAK, contribui para a aquisição de quimiorresistência (Figura 3), além de aumento de invasão e metástase, através da ativação de fatores de transição epitélio-mesenquimal (EMT), da secreção de metaloproteínases (MMPs) e liberação de citocinas pró tumorais (Wei et al. 2013; Li et al. 2015). A resposta adaptativa pode ocorrer imediatamente ou após o tratamento a longo prazo (Figura 2), através da ativação de vias não canônicas, como a ativação das quinases CRAF (outro membro da família RAF), *Cancer Osaka thyroid* (COT, também denominada *tumor progression locus 2* - Tpl2, ou ainda

MAP3K8) e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), dentre outras, que levam à superativação de ERK (Carlino et al. 2013; Rosell et al. 2013; Shi et al. 2014; Spagnolo et al. 2015).

Figura 3. Mecanismos de aquisição de resistência a BRAFi: 1, ativação de RTKs, podendo sinalizar para as vias de CRAF (1A) ou PI3K (1B); 2, mutação concomitante em NRAS; 3, surgimento de uma variante truncada de BRAF V600E, oriunda de *splicing* alternativo; 4, mutação concomitante em MEK; 5, superexpressão de BRAFV600; 6, perda de da proteína de neurofibromatose tipo 1(NF1); 7, COT, uma ativação alternativa da via de MAPK.

Fonte: Retirado de Sullivan et al. 2013.

A evasão à morte por apoptose em resposta à quimioterapia permite vantagem seletiva na progressão tumoral e formação de metástase (Soengas & Lowe 2003; Verhaegen et al. 2006; Kaneko et al. 2007). Os membros da família antiapoptótica BH3-*only*, como as oncoproteínas de linfoma de células 2 (Bcl-2), de linfoma de células B x_L (Bcl- x_L) e de leucemia mielóide celular 1 (Mcl-1), estão superexpressos em melanoma e atuam conjuntamente na inibição de morte celular programada. (Soengas 1999; Bollag et al. 2010; Ossowski & Aguirre-Ghiso 2010). A inibição do fator de ativação de protease associada a apoptose 1 (Apaf-1) também contribui para aquisição de quimiorresistência e evasão de morte celular em melanoma (Soengas et al. 2006).

Além da superexpressão de perfis que contribuem para o fenótipo maligno, diversas alterações epigenéticas possuem papel importante na modulação da expressão de genes críticos para a transformação maligna e aquisição de quimiorresistência (Lopez et

al. 2009; Valastyan & Weinberg 2011). Um desses eventos é a hipermetilação em genes supressores que são silenciados durante a progressão tumoral (Soengas et al. 2001; Wang et al. 2005; Chang et al. 2006; Lopez et al. 2009). A metilação do DNA influencia a organização da cromatina, e leva à repressão de genes e elementos transponíveis. As marcas epigenéticas atuam simultaneamente para regular a transcrição gênica em um processo complexo, e pequenas falhas no estabelecimento ou manutenção desses podem desencadear o desenvolvimento de patologias, como a encontrada em síndromes genéticas e no câncer (Vidanes et al. 2005; Roperó & Esteller 2007). Além da metilação, alguns padrões aberrantes de modificações de histonas também contribuem para a inibição de supressores tumorais e, portanto, para progressão do tumor (Vidanes et al. 2005; Roperó & Esteller 2007). Os níveis de acetilação de histonas desempenham um papel crucial no remodelamento da cromatina e na regulação da transcrição gênica (Polo & Almouzni 2005; Vidanes et al. 2005; Roperó & Esteller 2007), e essas modificações são resultantes do equilíbrio das atividades das acetiltransferases (HAT), que ativam a transcrição gênica, e desacetilases de histonas (HDAC), que inibem a transcrição (Roperó & Esteller 2007). Em melanoma, as HDACs tem papel crucial na regulação de um grande número de genes por interação direta com fatores de transcrição, tais como E2F, o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), a proteína p53, a proteína de retinoblastoma (pRB), o fator nuclear kappa B (NF-kB), o fator de transcrição II E (TFIIE), entre outros (Polo & Almouzni 2005; Shao & Aplín 2012; Bennetzen et al. 2013; Wei et al. 2013). Trabalhos recentes tem demonstrado que as HDACs atuam como mediadores da inibição da apoptose e aquisição de resistência a BRAFi (Shao & Aplín 2012; Lai et al. 2013).

Diversos supressores tumorais importantes se encontram inibidos durante a progressão do melanoma. Por exemplo, o gene supressor correspondente à fosfatase e tensina homólogas deletadas do cromossomo 10 (PTEN) está silenciado em 5 a 20% dos pacientes com melanoma metastático (Dankort et al. 2009); o regulador de apoptose Apaf-1 está inibido em 35 a 50% dos melanomas (Soengas et al. 2006); e controladores do ciclo celular, como a quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), p16/INK4 e p21, estão ausentes em tumores em estágios avançados (Meyle & Guldborg 2009; Ko & Fisher 2011). A proteína *Reversion-Inducing-Cysteine-rich protein with Kazal motifs* (RECK), que apresenta atividade supressora tumoral em diversos modelos, também encontra-se inibida em neoplasias e sua inibição está diretamente relacionada a pior prognóstico (Noda et al. 2003; Chang et al. 2006; Noda & Takahashi 2007; Lin et al. 2013; Leite et al. 2015).

Alguns perfis genéticos, embora não sejam essenciais para a transformação maligna, podem associar-se a outras alterações e acelerar o processo neoplásico. É o caso da inibição de MITF que, embora por si só não seja responsável pela transformação maligna de melanócitos normais, pode cooperar com a mutação em BRAF V600E para migração do fator EMT β -catenina para o núcleo, encontrada em 28% dos casos de melanoma metastático, e influenciar positivamente o potencial invasivo e quimiorresistente dessas células (Garraway et al. 2005; Goding 2013; Müller et al. 2014).

Segundo o trabalho de Niezgoda e colaboradores (2015), as opções de tratamento são limitadas também devido a heterogeneidade genética e epigenética dos tumores dos pacientes. Essas alterações gerariam instabilidade no genoma que, associadas a mudanças no microambiente tumoral, poderiam selecionar populações clonais que são intrinsicamente resistentes ao tratamento (Marusyk & Polyak 2011; Roesch 2015). Segundo essa teoria, as populações tumorais apresentariam diversos clones com potencial proliferativo, invasivo e quimiorresistente variáveis (Swanton 2012; Chapman et al. 2013; Shi et al. 2014). Identificar e eliminar essas subpopulações é um dos maiores desafios para transpor a quimiorresistência do melanoma.

Os exemplos apresentados até o momento demonstram que muitos elementos-chave têm sido identificados, porém o estudo de outras alterações que possam melhor elucidar os processos de progressão tumoral e aquisição de resistência ainda são necessários, a fim de identificar a fase de evolução tumoral na qual se encontra cada paciente e adequar a abordagem terapêutica específica para cada indivíduo (Gray-Schopfer et al. 2007; Kemper et al. 2015).

CAPÍTULO 1

Regulação epigenética de RECK em melanoma metastático humano

1. INTRODUÇÃO: Expressão de RECK em tumores

O gene RECK tem sido amplamente expresso em diversos tecidos normais (Furumoto et al. 2001; Alexius-lindgren et al. 2014). Sua função fisiológica foi relacionada ao remodelamento de vasos sanguíneos durante a morfogênese (Meng et al. 2008; Oh et al. 2011). Ele foi descrito pela primeira vez como um gene supressor de transformação maligna em fibroblastos murinos que superexpressavam o oncogene KRAS (homólogo do oncogene viral de sarcoma de Kirsten de rato, também conhecido como *v-Ki-ras*) (Takahashi et al. 1998). Além de RAS, já foi relatado que o oncogene referente ao receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-2/neu) também pode inibir a expressão de RECK (Hsu et al. 2006).

A primeira função descrita para RECK foi sua capacidade de inibir a atividade de MMPs, como a inibição da liberação e ativação de MMPs dos tipos 2, 9 e 14, principalmente (Takahashi et al. 1998; Noda et al. 2003; Simizu et al. 2005; Jacomasso et al. 2014). Ensaios de *Northern Blotting* e *small interfering RNA* (siRNA) sugeriram que a inibição de MMP-9 por RECK é pós-transcricional, impedindo a liberação da enzima para o meio extracelular (Sasahara et al. 2002; S. Takagi et al. 2009) (Fig. 4). Por isso, RECK foi caracterizado como supressor tumoral, devido a sua função inibitória dos processos de invasão e metástase (Takahashi et al. 1998; Noda & Takahashi 2007).

Figura 4. Inibição de metaloproteínases via proteína RECK. RECK é inibida intracelularmente pelo oncogene RAS. RECK é capaz de inibir a liberação e atividade de MMP-9. Além disso, também inibe a formação do complexo ternário formado por TIMP-2, MT1-MMP (MMP-14) e Pro-MMP2, e a ativação de MMP-2 e MT1-MMP.

Fonte: Adaptado de http://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta/m_reckPathway

Outra função relatada é sua modulação sobre a migração celular independente de MMPs. Já foi visto que a superexpressão de RECK foi capaz de conter o processo migratório sem alteração da atividade enzimática, através de sua localização no lamelipódio e de alterações em filamentos de actina (Berg et al. 2008; Corrêa et al. 2010; Wei et al. 2013). RECK é estruturalmente caracterizada como uma proteína de membrana ancorada ao fosfolípido glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Noda et al. 2003; Simizu et al. 2005). A secreção extracelular de RECK também pode ser detectada no sobrenadante celular, caso as células sejam tratadas com fosfolipase C, que cliva os fosfolípidos imediatamente antes do grupo fosfato, ou através da expressão de isoformas proteicas truncadas, que não apresentam a posição carboxi-terminal que se liga ao GPI (Noda et al. 2003).

Além de controlar os mecanismos de invasão e migração celular, já foi relatado que RECK também pode influenciar a vias de sobrevivência de RAS/PI3K e de proliferação celular. A inibição de RECK é capaz de induzir o aumento transitório da proteína quinase AKT e a fosforilação de ERK, associado a superexpressão de ciclina D1, p19, p53 e p21, indicando que a depleção de RECK leva a um *feedback* positivo para a sinalização de RAS e senescência celular subsequente (Kitajima et al. 2011; Han et al. 2012; Xue et al. 2014).

Em tumores, há uma correlação direta entre a expressão de RECK e sobrevida dos pacientes (Noda et al. 2003). Em melanoma, a função desse gene ainda não foi totalmente elucidada. Sabe-se que o mesmo encontra-se inibido em diversas linhagens celulares, embora não seja consenso entre as amostras avaliadas (Oh et al. 2004; Liu et al. 2008; Chang et al. 2014; Jacomasso et al. 2014; Zhang et al. 2015). Após analisar biópsias de nevos melanocíticos benignos (NMB) e amostras de melanoma metastático cutâneo (MMC), Zhang e colaboradores (2015) relataram que RECK estava expresso em todos os casos de NMB e em somente 10% das amostras de MMC, sugerindo que a expressão de RECK seja perdida durante a progressão tumoral e que ele possa ser utilizado como marcador de bom prognóstico (Oh et al. 2004; Clark et al. 2007; Liu et al. 2008; Berger et al. 2010; Nagini 2012; Chang et al. 2014; Jacomasso et al. 2014; Zhang et al. 2015). Embora fusões gênicas sejam raras em melanoma, Berger e colaboradores (2010) identificaram uma fusão entre o cromossomo 1 e o cromossomo 9 que poderiam caracterizar mais um mecanismo de inibição de RECK, visto que, após análise do transcriptoma, os dois transcritos quiméricos oriundos da fusão do éxon 13 do gene *RECK* com o éxon 3 do gene homeobox *ALX3* e do éxon 14 de *RECK* com o éxon 4 de *ALX3* não geram proteína quimérica funcional (Berger et al., 2010).

Takahashi e colaboradores (1998) afirmam que a expressão do gene RECK é inibida durante a transformação maligna, o que resulta em alta atividade de MMPs, que contribuem para a remodelamento da matriz e aumento da invasão das células tumorais. De acordo com Oh e colegas (2001), quando a expressão de RECK é restaurada em células malignas, a diminuição da secreção de MMPs é observada, correlacionando-se, portanto, a expressão da RECK à contenção de invasão e metástase tumorais.

A inibição de RECK em tumores já foi amplamente descrita (Chang et al. 2006; Corrêa et al. 2010; Walsh et al. 2012; Discacciati et al. 2015). O bloqueio de sua função anti-invasiva em tumores deve-se a modificações pós-traducionais, como a glicosilação proteica (Simizu et al. 2005); pós-transcricionais, através da inibição do RNA mensageiro por microRNAs ou por fusão gênica (Berger et al. 2010; Han et al. 2012; Lin et al. 2013;

Leite et al. 2015); e por alterações epigenéticas, como a hipermetilação de seu promotor gênico e remodelamento da cromatina por desacetilases de histonas (Chang et al. 2006; Hsu et al. 2006; Chang et al. 2007; Liu et al. 2008a; Lee et al. 2010; Zhou et al. 2014; Wang et al. 2015). Embora a glicosilação não seja requerida no processo de ancoragem de RECK à membrana celular, esse mecanismo impede sua atividade sobre as MMPs presentes nas células tumorais (Simizu et al. 2005).

Segundo Schinke e colaboradores (2010) a hipermetilação do DNA em melanoma pode ser considerada como uma das mais importantes etapas do desenvolvimento tumoral, devido a inibição de supressores tumorais essenciais à transformação maligna, como RECK. Portanto, o uso de agentes desmetilantes, como 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dC, comercialmente conhecido como Decitabina) e 5-azacitidina (5-aza-C, comercialmente conhecido como Vidaza), pode ser uma abordagem interessante na identificação de potenciais supressores tumorais, já que a utilização tanto desses desmetilantes quanto inibidores de HDAC (HDACi), como a tricostatina A (TSA), embora aprovados pela FDA para tratamento de melanoma uveal e cutâneo, apresenta pouca eficácia clínica quando utilizados sozinhos, pois, devido a sua rápida degradação, não impedem a reativação da supressão gênica (Chang et al. 2007; Meng et al. 2008; Zhou et al. 2014).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a função de RECK na biologia do melanoma metastático humano, a partir da caracterização do padrão de expressão de gene nas diferentes linhagens de melanoma utilizadas neste estudo, comparadas com melanócitos normais humanos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Linhagens celulares*

Foram utilizadas linhagens de melanoma humano com diferentes alterações genotípicas, como descritas na Tabela 1. Culturas primárias de melanócitos e fibroblastos humanos normais, provenientes do banco de células do Laboratório de Citopatologia Clínica da FCF-USP, o qual foi ampliado através do isolamento de pele de prepúcio de doadores (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Protocolo CEP nº 424 – Anexo 1) foram utilizadas como controle. As células foram cultivadas à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os fibroblastos e as linhagens de melanomas foram mantidos em meio DMEM (Gibco Life Sciences, Grand Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco Life Sciences, Grand Carlsbad, CA, USA) e antibióticos (100 U/mL de ampicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Gibco Life Sciences, Grand Carlsbad, CA, USA). Já os melanócitos foram mantidos com meio 254CF (SKU# M-254CF-500, Life Sciences, Grand Carlsbad, CA, USA), suplementado com Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS - SKU# S-002-5, Life Sciences, Grand Carlsbad, CA, USA) e antibióticos, na mesma concentração para o meio DMEM.

Tabela 1. Linhagens de melanoma metastático humano utilizadas nos experimentos descritos no Capítulo 1, pertencentes ao banco de células do Laboratório de Citopatologia Clínica – FCF/USP

Tipo Celular	<i>TP53</i>	<i>p53</i> (prot.)	<i>CDKN2A</i> , <i>p14^{ARF}</i> (RNAm)	<i>CDKN2A</i> , <i>p16^{Ink4A}</i> (RNAm)	<i>BRAF</i> (V600E)	<i>NRAS</i> (éxon 3)	<i>Apaf-1</i> (prot.)	<i>Casp. 8</i> (prot.)	<i>Bcl-2</i> (prot.)	<i>Bcl-xL</i> (prot.)	<i>Mcl-1</i>
SK-Mel-19	wt	+	+	+	mutante	wt	++	++	+++	++	+
SK-Mel-28	R273H	-	ND	+	mutante	wt	-/+	++	++	++	++
SK-Mel-103	wt	+	+	+	wt	Q61R	-	+	++	+++	+++
SK-Mel-147	wt	+	-	+	wt	Q61R	-	+	++	+++	+++
G-361	wt	+	+	-	wt/mutante	wt	-	-	+++	++	ND
UACC-62	wt	+	-	-	mutante	wt	+	++	++	+	ND
WM-1366	ND	ND	ND	ND	wt	Q61R	++	+++	++	+++	++

Legenda: wt: *wild-type* ou selvagem; RNAm: RNA mensageiro; ND: não detectado; prot.: proteína; *TP53* R273H: mutação *hot spot*, que resulta na substituição de arginina por histidina na posição 273 da proteína, ocasionando ganho de função, por perda de supressão tumoral e aquisição de novas atividades oncogênicas (Hainaut & Hollstein 2000; Liu et al. 2010); *BRAF* (V600E): mutação ocasionada pela substituição de adenina por timina, no nucleotídeo 1796 (A1796T), que resulta na substituição de valina por ácido glutâmico na posição 600 da proteína, mutação presente em aproximadamente 60% dos melanomas (Goydos et al. 2005); *NRAS* (éxon 3) Q61R: mutação ocasionada pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 182 (A182G), localizado no éxon 3, que resulta na substituição de glutamina por arginina majoritariamente na posição 61 da proteína, mutação que ocorre em aproximadamente 20% dos melanomas (Fukushima & Takenoshita 2005; Goydos et al. 2005).

Além das linhagens tumorais e culturas primárias do banco de células do Laboratório de Citopatologia Clínica da FCF – USP, este estudo também utilizou amostras de DNA complementar (cDNA) de 20 melanomas cutâneos primários, gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Ana Cristina V. Krepischi (Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB – USP). A casuística de tumores foi selecionada de acordo com os critérios descritos na dissertação de mestrado de MSc. Dimitrius Pramio (2015) e as amostras foram aprovadas pelo Comitê de Ética local (projeto nº 1765/13 – Anexo 1). A Tabela 2 sumariza as principais características clínicas e anatomopatológicas das amostras de melanomas cutâneos primários utilizados neste estudo, que foram comparadas com amostras de culturas primárias de melanócitos humanos normais como condição-controle.

Legendas: M= Masculino; F= feminino; Raça: raça auto-declarada; Ca= Caucasiano; Am= Amarelo; TNM sistema de estadiamento patológico proposto pela American Joint Committee on Cancer (AJCC): (T) profundidade do tumor, medida no melanoma pela escala de Breslow (em mm), em associação ou não à presença de ulceração; (N) avaliação de linfonodos regionais, verificando a presença e quantidade de nódulos metastáticos (macrometástases e micrometástases) e metástases intra-linfáticas; (M) presença de metástases à distância, em combinação com a concentração sérica da enzima lactato desidrogenase; ND= Não descrito; S= sim; N= não.

Fonte: Retirado de Pramio (2015).

Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes e anatomopatológicas dos melanomas cutâneos primários estudados.

Identificação	Sexo	Idade	Raça	Tipo histológico	TNM	Ulceração	Breslow (mm)	Infiltrado Inflamatório Intra-tumoral	Metástase Pareada
AL #1	F	77	ND	Acral lentiginoso	T2aN0M0	S	2,2	S	S
AL #2	M	54	Ca	Acral lentiginoso	T4bN1bM0	S	15,0	N	N
AL #3	M	77	Ca	Acral lentiginoso	T4bN1bM0	N	30,0	N	S
AL #4	M	40	Ca	Acral lentiginoso	T4bN2aM0	S	4,0	S	N
AN	M	69	Ca	Acral nodular	T4bN3M0	S	7,0	N	N
D #1	M	86	Ca	Desmoplásico	T4aNxM0	N	9,0	S	N
D #2	M	61	Ca	Desmoplásico	TxNxMx	ND	ND	ND	N
ES #1	M	30	Ca	Extensivo superficial	T2aN1M0	N	1,9	S	N
ES #2	M	79	Ca	Extensivo superficial	T2bN2bM0	S	1,8	N	N
ES #3	M	78	ND	Extensivo superficial	T4bN1bM1a	S	6,8	S	S
ES #4	F	82	ND	Extensivo superficial	T3bN0M0	S	2,9	N	N
LM	F	72	Ca	Lentigo maligno	TxNxMx	S	ND	ND	N
MU	F	38	Ca	Maligno ulcerado	TxN0M0	S	ND	ND	N
N #1	M	64	Ca	Nodular	T4aN1aM0	N	4,3	S	S
N #2	F	84	Ca	Nodular	T4bN1bM0	S	11,0	S	N
N #3	M	54	Ca	Nodular	TxNxMx	ND	ND	ND	N
NC #1	M	4	ND	Não classificável	TxNxM0	S	ND	N	S
NC #2	M	57	Am	Não Classificável	T4aN3M0	N	9,9	N	S
NC #3	M	79	Ca	Não classificável	T4aN0M0	N	6,3	S	N
T	M	70	ND	Tumoral	T4bN3M0	S	11,0	S	S

3.2. *Análise de expressão gênica através PCR em tempo real*

3.2.1. Extração do RNA total

O ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído utilizando-se o Kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Germany), segundo instruções do fabricante. O RNA total, previamente aquecido a 65°C por 5 minutos, foi quantificado através do espectrofotômetro de luz UV a 260 nm e sua qualidade foi verificada pela relação A_{260}/A_{280} e por corrida em gel de agarose 1,5%, visualizado sob a luz ultravioleta após coloração com Gel Red (Biotinum).

3.2.2. Transcrição reversa (RT-PCR) para síntese de cDNA

O RNA (1µg) foi previamente aquecido a 65°C e foi incubado com 0,5 µL de 2 U/µL DNase I (Life Technologies), 2 µL de 5X *First Strand Buffer* (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA) e 0,5 µL de 40 U/µL RNase OUT (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA) a 37°C por 10 minutos, seguido de incubação a 75°C por 5 minutos. Para a reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), o mix da reação anterior foi incubado com 1 µL de 10 mM desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP - Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA), 0,5 µL de 500 µg/µL Oligo (dT) Primer (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA) e 0,5 µL de 100 ng/µL Random Primer (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA) a 75°C por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado mix composto de 2 µL de 5X *First Strand Buffer* (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA), 2 µL de 1M ditiotreitol (DTT - Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA), 0,5 µL de 40 U/µL RNase OUT (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA) e 2,5 µL de água MilliQ® (Millipore) a 25°C por 10 minutos, seguido de incubação a 42°C por 2 minutos. Após este período, foi adicionado 1 µL de 200 U/µL SuperScript III (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA) a 42°C por 2 horas, seguido de incubação a 72°C por 10 minutos. Para eliminar possíveis RNAs contaminantes, após esse período foi adicionado 1 µL de 5 U/µL RNase H (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA) a 37°C por 30 minutos, seguido de incubação a 72°C por 10 minutos. Ao produto final da reação (ácido desoxirribonucleico complementar ou cDNA), foi adicionado 40 µL de Tris-EDTA

(TE). As amostras de cDNA não foram quantificadas, visto que o produto da reação continha, além de cDNA, diversos dNTPs, que poderiam indicar um falso positivo na quantificação. Portanto, considerou-se que todo o RNA mensageiro contido no RNA total inicial foi convertido em cDNA. Para uso na placa de Real-Time PCR, o cDNA utilizado não foi diluído.

3.2.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

As reações de Real-Time PCR foram realizadas com volume final de 12 μ L, contendo 3 μ L de 2,4 μ M do mix dos *primers Forward* e *Reverse* de cada gene, 3 μ L de cDNA, proveniente da RT-PCR, e 6 μ L de Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Foram utilizados os *primers* para o gene *RECK* e, como controle interno, *GAPDH* e *18S*. A escolha do gene endógeno foi realizada a partir da avaliação da expressão gênica relativa, por Real Time PCR, de quatro genes conhecidamente constitutivos em melanoma: *GAPDH*, *18S*, *B2M* e *Beta-actina*. O(s) gene(s) que apresentou(aram) a expressão mais homogênea entre as linhagens utilizadas foi(ram) escolhido(s) como o controle endógeno da expressão gênica relativa ao gene alvo.

O ensaio de Real Time PCR foi realizado no aparelho Gene Amp 7500 Sequence Detection System v2.0.5 (PE - Applied Biosystems), localizado no Laboratório do Prof. Mário Hirata (Laboratório de Bioquímica Clínica, FCF – USP), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento dos *primers* e extensão a 60°C por 1 minuto. Os dados foram analisados utilizando-se o método de quantificação comparativa ΔC_T (expressão gênica relativa), segundo Livak e Schmittgen (2001).

3.3. *Análise de expressão proteica por Western Blot*

3.3.1. Extração proteica

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de Petri próprias para cultura celular de 100 mm de diâmetro e mantidas em 5% CO₂, 37°C, até atingirem a subconfluência. As culturas foram lavadas duas vezes em PBS à 4°C, lisadas com tampão de lise *Radio Immuno Precipitation Assay* (RIPA - 50 mM Tris base pH 7,5,

150 mM NaCl, Nonidet P-40 1%, 1 mM EDTA pH 7,4, SDS 0,05%, Sigma *FAST* Protease Inhibitor Tablet (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 1X e Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 1%), raspadas com o auxílio de *cell scraper* e transferidas para um tubo cônico. As células foram incubadas, juntamente com o tampão de lise, por 20 minutos a 4°C. Em seguida, foram centrifugadas a 16000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o "pellet" foi descartado. O material foi aliquotado e estocado a -80°C. Todo o processo foi realizado a 4°C.

3.3.2. Fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de acrilamida e reação com o anticorpo

As amostras foram normalizadas de acordo com a quantidade de proteína, utilizando-se o método de Bradford (1976), com o uso de Reagente de Bradford (Bio-Rad) e curva padrão de BSA (albumina sérica bovina). Em geral, utilizou-se 30 µg de proteína total para cada canal. Foram, então, fracionadas por eletroforese em gel 8% poliacrilamida (30 acrilamida: 1 bisacrilamida), para a proteína RECK, e transferidas para membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF - Amersham) por transferência semi-seca. As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio (Tris-Buffer com 0,02% de Tween 20, TBST, e 5% leite desnatado) à temperatura ambiente, por 1 hora e incubadas com o anticorpo primário desejado (diluído em TBST) *overnight*, a 4°C, com agitação. As membranas foram, então, lavadas 3X em TBST e incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse ou anti-rabbit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 1:5000, diluído em TBST, por 1 hora à temperatura ambiente, com agitação. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas 3X em TBST e reveladas por quimiluminescência, utilizando-se o kit ECL para detecção de proteínas (Amersham). As membranas foram expostas a filmes de raio-X (Kodak X omat K) por diferentes períodos de tempo. Os anticorpos utilizados foram anti-RECK (Millipore), na diluição de 1:300, e anti- α -tubulina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), na diluição de 1:2500.

3.4. Remoção de marcas epigenéticas associadas ao silenciamento gênico pelo tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina e tricostatina A

Para investigar a possível inibição epigenética em RECK, ou ainda em genes que poderiam modulá-lo, foram utilizados os compostos 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-dC) e tricostatina A (TSA), a fim de impedir a metilação do promotor e inibir a desacetilação de histonas por HDACs, respectivamente, favorecendo a expressão gênica. O protocolo de tratamento foi baseado em diversos trabalhos da literatura (Shaker et al. 2003; Meng et al. 2008; Pryzbylkowski et al. 2008; Kong et al. 2011; de Souza et al. 2012). Inicialmente, realizou-se uma curva de viabilidade celular nas linhagens de melanoma SK-Mel-28 e SK-Mel-103, para a escolha de doses não tóxicas ($\geq$ IC₂₀). As culturas foram tratadas diariamente com doses de 1 e 5 μ M de 5-aza-dC, de 1 a 4 dias consecutivos, e no último tratamento foi adicionado 5 nM de TSA. Após o tratamento, analisou-se a expressão gênica de *RECK* por Real Time PCR.

3.5. Quantificação proteica de RECK por citometria de fluxo

A quantificação de da proteína RECK foi detectada foi citometria de fluxo, através de tripsinização e fixação das células com etanol 70% a 4°C overnight, bloqueio com solução contendo BSA 1% em PBS e Triton X-100 0,1% por 1 hora a temperatura ambiente, incubação com o anticorpo primário anti-RECK (BD) e anticorpo IgG de cabra anti-mouse conjugado-Alexa Fluor® 488 (Invitrogen). A intensidade de fluorescência foi determinada com a utilização de citômetro de fluxo e os resultados foram analisados pelo software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

3.6. Inibição de *RECK* em células normais de melanócitos normais humanos

Para o silenciamento de *RECK* em culturas celulares, foram utilizados vetores que continham sequências *short-hairpin* RNA (shRNA) para inibição do RNA mensageiro (RNAm) desse gene. O vetor lentiviral utilizado foi pLKO.1 puro (Figura 5) e o sistema utilizado para empacotamento lentiviral foi o Mission shRNA (Sigma, USA). Para o ensaio, foram utilizadas cinco sequências distintas de shRNA para *RECK* (R23, R24, R25, R26 e R27), que inibem diferentes regiões do RNAm de *RECK* (Figura 6).

- *RECK* 23 (R23):

CCGGGCTGATTAAATGACACTCATACTCGAGTATGAGTGTCATTTAATCAGC
TTTTTG

- *RECK* 24 (R24):

CCGGCGCCTCTATTAGTCCACAATTCTCGAGAATTGTGGACTAATAGAGGCG
TTTTTG

- *RECK* 25 (R25):

CCGGGCGCCTCTATTAGTCCACAATCTCGAGATTGTGGACTAATAGAGGCG
CTTTTTG

- *RECK* 26 (R26):

CCGGGCATTGTTGTTCTAAAGCAAACCTCGAGTTTGCTTTAGAACAACAATGC
TTTTTG

- *RECK* 27 (R27):

CCGGGCAGATCAGTTTGTCCCTGTACTCGAGTACAGGGACAAACTGATCTG
CTTTTTG

Os vetores lentivirais sem a sequência de interesse ou contendo sequências aleatória de nucleotídeos (*scramble*) foram utilizados para a geração dos controles. Inicialmente, os vetores lentivirais foram transfectados juntamente com os vetores empacotadores em células HEK 293T, de acordo com instruções do fabricante. O empacotamento viral gera as partículas virais inativas que são secretadas no meio de cultura dessas células. Os melanócitos ou fibroblastos humanos foram, então, infectados com este título viral e as populações transduzidas foram selecionadas de acordo com o vetor utilizado. As populações contendo shRNA para *RECK*, juntamente com os controles citados acima e com a cultura sem o vetor, foram selecionadas utilizando-se doses crescentes do antibiótico puromicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) até

atingir 2 µg/mL, concentração citotóxica para culturas não resistentes, sensíveis ao antibiótico.

Figura 5. Mapa do vetor pLKO.1 puro, utilizado para o silenciamento de *RECK* em melanócitos e fibroblastos.

Fonte: Retirado de <http://www.addgene.org>.

Figura 6. Sequências shRNA para *RECK* que inibem diferentes regiões do transcrito (RNAm).

3.7. Superexpressão de RECK em linhagens celulares de melanoma metastático humano

Utilizaram-se dois sistemas de superexpressão para as linhagens de melanoma metastático humano: transfecção plasmidial e infecção lentiviral. Para confirmar se os vetores utilizados continham o tamanho esperado e o inserto de interesse, foi realizada digestão enzimática seguida de eletroforese em gel de agarose 0,7%, visualizado sob a luz ultravioleta após coloração com Gel Red (1:10000 – Biotium).

3.7.1. Transfecção plasmidial

O vetor plasmidial utilizado foi pCXN2 (Figura 7), doado pelo Prof. Chiaki Takahashi (Cancer Research Institute and Kyoto University Graduate School of Medicine, Japão). Este vetor possui a sequência do gene *neo* que promove resistência a geneticina (G418). Esta sequência de 1145 pares de bases (pb) foi isolada do vetor pMC1neo-poly A (Stratagene) e inserida no vetor pCAGGS (Pluripotent Cell Studies), de 4802 pb, no sítio de Sall, gerando o pCXN2 com 5947 pb (Niwa et al. 1991). O local de inserção do cDNA do gene de interesse (*RECK*) é precedido por um promotor fortemente expresso, derivado de β -actina de galinha (Niwa et al. 1991). Promotores fortes são encontrados em genes que apresentam nível basal de transcrição alto. A transfecção foi realizada com auxílio de um reagente lipofílico (X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent – Roche Diagnostics), que envolve o plasmídeo e funde-se à membrana celular, inserindo o vetor no interior da célula. Para cada 1 µg de DNA plasmidial, utilizou-se 3 µL do reagente. As populações foram selecionadas com o antibiótico G418 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), utilizando-se doses crescentes até atingir 1 mg/mL, concentração citotóxica para culturas não resistentes, sensíveis ao antibiótico.

Figura 7. Mapa do vetor pCXN2, utilizado para a superexpressão de *RECK* em linhagens de melanoma metastático humano. A flecha indica o local de inserção do cDNA de *RECK*, precedido pelo promotor forte derivado de β -actina de galinha.

3.7.2. Infecção lentiviral

O vetor lentiviral utilizado foi FG12-CMV, doado pela Profa. María S. Soengas (Comprehensive Cancer Center, CNIO, Espanha), que contém uma sequência *green fluorescent protein* (GFP). Para construção do vetor contendo *RECK*, a sequência do gene foi isolada do vetor pBlueScript (Stratagene), doado pelo Professor Chiaki Takahashi (Cancer Research Institute and Kyoto University Graduate School of Medicine, Japan), e seu cDNA foi clonado pelo mesmo entre os sítios para NheI e XhoI (Figura 8). Os vetores empacotadores utilizados foram p59, p60 e p61 (Brohem et al. 2012). Os protocolos de infecção estão descritos a seguir.

Figura 8. Mapa do vetor FG12, utilizado para a superexpressão de *RECK* em linhagens de melanoma metastático humano. As setas pretas e vermelhas indicam a sequência para GFP e o local de inserção do cDNA do gene *RECK* precedido pelo promotor CMV, respectivamente.

- *1º Protocolo:*

Inicialmente, as células HEK 293T foram plaqueadas em placas de Petri de 100 mm de diâmetro e, após atingirem confluência de aproximadamente 90%, o meio foi trocado e adicionou-se 9 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB e 25 μ M de cloroquina. Em seguida, adicionou-se, para cada condição, solução contendo 4 μ g do vetor lentiviral, 4 μ g de cada vetor empacotador (p59, p60, p61), 250 mM CaCl_2 , HBS 1X (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12 mM dextrose (D-glucose), 50 mM HEPES) e água MilliQ autoclavada, preparada de acordo com Brohem e colaboradores, 2012. As culturas foram mantidas à temperatura de 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 e o meio foi trocado após 8 horas para remover a cloroquina.

Enquanto isso, as linhagens de melanoma humano (SK-Mel-28 e -103) foram plaqueadas em placas de Petri de 100 mm de diâmetro. Vinte e quatro horas após a transfecção, o sobrenadante foi coletado, filtrado com filtro de 0,45 µm, para remoção de células mortas, e utilizado para a primeira infecção nas células de melanoma. Para isso, o meio das culturas de melanoma foi descartado, adicionou-se 5 mL de meio condicionado contendo o título viral suplementado com Polybreen (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) na concentração final de 4 µg/mL e as culturas foram mantidas à temperatura de 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Adicionou-se novamente meio DMEM suplementado com 10% SFB nas células HEK 293T e no dia seguinte, ou seja, 48 horas após a transfecção, realizou-se a segunda infecção lentiviral nas culturas de melanoma, adicionando-se mais 5 mL de meio contendo o título viral suplementado com Polybreen. As células HEK 293T foram descartadas e 8 horas após a segunda infecção, o meio das culturas de melanoma foi trocado. A partir do dia seguinte, a seleção por fluorescência foi iniciada. A eficiência de infecção foi avaliada por citometria de fluxo, pois o vetor FG12-CMV não apresenta gene de seleção para antibiótico (Fig. 8).

- *2° Protocolo:*

Após a baixa eficiência da superexpressão, o primeiro protocolo foi modificado, a fim de melhorar a infecção lentiviral. Para o plaqueamento das células HEK 293T, diminuiu-se a confluência para 50-60%. Além disso, a primeira e a segunda infecções lentivirais foram ambas realizadas dois dias após a transfecção, com intervalo de quatro horas entre elas. Para isso, adicionou-se sobre o meio das culturas de melanoma 3 mL de meio condicionado contendo o título viral suplementado com Polybreen (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) na concentração final de 4 µg/mL e as culturas foram mantidas à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Quatro horas após a segunda infecção, o meio das culturas de melanoma foi trocado. A partir do dia seguinte, a seleção por fluorescência foi iniciada.

3.8. Análise da eficiência de infecção lentiviral por citometria de fluxo

As células contendo vetor lentiviral FG12-CMV foram tripsinizadas e ressuspensas em 200 µL de PBS + SFB 3%. Em seguida, foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Canto II - BD), com o auxílio da Especialista de Laboratório MSc. Renata Chaves de Albuquerque (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP), no canal para FITC (excitação a 488 nm e emissão a 533 nm). Por fim, a fluorescência das células contendo o vetor sem o inserto de interesse (*RECK*) e das células contendo o inserto foram comparadas com a cultura não infectada, e o *background* foi descontado.

3.9. Curva de crescimento por exclusão de Azul de Tripan

A curva de crescimento foi avaliada pelo ensaio de exclusão do corante Azul de Tripan 0,4% em PBS (Freshney 1987), o qual cora somente as células não viáveis. As células foram plaqueadas e contadas 24 e 48 horas após o plaqueamento. Para contagem, utilizou-se a câmera de Neubauer® e o número total de células foi extrapolado utilizando o fator de correção da mesma. As curvas foram plotadas utilizando-se o programa Microsoft® Excel 2007.

3.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente, utilizando-se o software GraphPad Prism 5 (One-way analysis of variance ANOVA, com valor de significância de $p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Expressão basal de RECK em melanoma metastático humano

A expressão constitutiva de RECK foi avaliada em um painel de sete linhagens de melanoma metastático humano que apresentam diferentes perfis de mutações, em comparação a culturas primárias de melanócitos e fibroblastos normais humanos (Figura 9). As células tumorais apresentaram diferente morfologia celular entre si (Figura 9).

Figura 9. Morfologia das linhagens celulares utilizadas para avaliação da expressão basal de RECK. Foram utilizadas linhagens de melanoma metastático humano comparadas com culturas primárias de melanócitos e fibroblastos normais humanos. Aumento: 100x.

Através da análise quantitativa da expressão gênica relativa (Figura 10), normalizada pela expressão gênica de RECK em melanócitos normais humanos, observou-se níveis de expressão gênica significativamente elevados em fibroblastos e na linhagem de melanoma metastático humano UACC-62, enquanto que nas outras linhagens a expressão de RECK foi menor (Figura 10).

Figura 10. Expressão gênica relativa de *RECK* por PCR em tempo real para linhagens de melanoma metastático e culturas primárias de melanócitos e fibroblastos normais humanos. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle interno da reação (*housekeeping gene*). Para análise estatística, utilizou-se o teste de Tukey e todas as amostras foram normalizadas pela expressão gênica do Melanócito. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, em comparação ao Melanócito.

Comparou-se, ainda, a expressão gênica relativa de RECK nas amostras de cDNA de melanomas primários cedidas pela Professora Ana Krepschi (IB – USP), a fim de correlacionar a expressão constitutiva de RECK em linhagens tumorais comparadas a melanomas e melanócitos primários humanos (Figura 11). A expressão gênica de RECK nas amostras dos pacientes evidenciou ainda mais o perfil heterogêneo da expressão gênica de RECK em melanoma.

Figura 11. Expressão gênica relativa de *RECK* por PCR em tempo real em amostras de melanoma cutâneos primários, cedidas pela Profa. Dra. Ana Krepischi (IB – USP), em comparação com cultura de melanócitos normais humanos FM305 e o Melanócito utilizado na Figura 10. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle interno da reação (*housekeeping gene*). Os melanomas foram classificados como acral lentiginoso (AL), acral nodular (AN), desmoplásico (D), extensivo superficial (ES), lentigo maligno (LM), maligno ulcerado (MU), nodular (N), não classificado (NC) e tumoral (T). Para análise estatística, utilizou-se o teste de Tukey e todas as amostras foram normalizadas pela expressão gênica do Melanócito. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, em comparação ao Melanócito.

Além disso, avaliamos os níveis proteicos de RECK nas linhagens de melanoma utilizando células de glioblastoma humano que superexpressam RECK, via transfecção plasmidial com vetor de expressão pCXN2 (T98G+), como controle positivo. Como se observa na Figura 12, células T98G+ apresentaram uma expressão proteica robusta para RECK pela presença de duas bandas nas posições 110 e 125 kDa, enquanto as linhagens de melanoma UACC-62 e G-361 apresentaram baixa expressão de RECK. As linhagens de melanoma SK-Mel-19 e SK-Mel-28 não apresentaram expressão proteica de RECK.

Figura 12. Expressão proteica constitutiva de RECK nas linhagens de melanoma, em comparação com cultura primária de melanócitos normais humanos (Melanócito) e com células de glioblastoma humano que superexpressam RECK (T98G+).

4.2. Remoção das marcas epigenéticas associadas ao silenciamento gênico através do uso de agentes desmetilantes globais do DNA e inibidores da desacetilação de histonas

A fim de investigar o papel da metilação global do DNA e desacetilação de histonas sobre a repressão da expressão gênica de RECK, utilizou-se agentes desmetilantes do DNA e inibidores da desacetilação de histonas. Para isso, foram verificados os efeitos de TSA e 5-aza-dC sobre duas linhagens de melanoma (SK-Mel-28 e SK-Mel-103), que apresentavam menor expressão de RECK, e cultura primária de fibroblastos humanos normais, utilizada como controle. Para definir as concentrações não tóxicas de TSA e 5-aza-dC, foram realizadas curvas de viabilidade celular (Anexo 1).

Após a escolha das concentrações não citotóxicas (5 nM para TSA, e 1 e 5 μ M para 5-aza-dC), as culturas de melanoma foram tratadas com os compostos concomitantemente por 48 horas (Anexo 1) e, então, avaliou-se a expressão gênica e proteica de RECK (Figuras 13 e 14, respectivamente) na linhagem de melanoma SK-Mel-28 após o tratamento concomitante com 5-aza-dC e TSA. Na Figura 13, foram encontrados níveis relativamente baixos de expressão gênica e houve diferença estatística entre o controle não tratado e o grupo tratado com 5-aza-dC e o tratamento

concomitante (Figura 13). Quanto à expressão proteica, não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos e o grupo controle não tratado (Figura 14).

Figura 13. Expressão gênica relativa de *RECK*, avaliada por PCR em tempo real, após tratamento concomitante com 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza) e tricostatina A (TSA) por 96 horas. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle interno da reação (*housekeeping gene*). A linhagem de melanoma SK-Mel-28 foi tratada diariamente com 5-aza (5 μ M). No último dia de tratamento, o meio de cultura foi trocado e as culturas células foram tratadas 5 nM de TSA por 24 horas adicionais. Para análise estatística, utilizou-se o teste de Dunnett e todas as amostras foram normalizadas pela expressão gênica do controle não tratado (NT). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

RECK: expressão proteica (eventos %)

NT (69,6%)

5-aza (70,5%)

TSA (62%)

TSA + 5-aza (56,7%)

Figura 14. Expressão proteica de RECK após tratamento concomitante com 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza) e tricostatina A (TSA) por 96 horas. A linhagem de melanoma SK-Mel-28 foi tratada diariamente com 5-aza (5 μ M). No último dia de tratamento, o meio de cultura foi trocado e as culturas células foram tratadas 5 nM de TSA por 24 horas adicionais. A expressão proteica foi avaliada por citometria de fluxo e o histograma representa a porcentagem de células marcadas de acordo com a intensidade da fluorescência.

4.3. Superexpressão de *RECK* em linhagens celulares de melanoma metastático humano

Para analisar o potencial supressor tumoral de *RECK*, avaliou-se sua superexpressão via utilização de vetores de expressão. Inicialmente, utilizou-se os vetores plasmidiais pCXN2 controle, e pCXN2 contendo o cDNA de *RECK* (Anexo I).

Após a confirmação do tamanho e da sequência do vetor e do inserto de cDNA de *RECK*, realizou-se a transfecção plasmidial para superexpressão desse gene em células de melanoma. As linhagens transfectadas SK-Mel-28 e -103 foram selecionadas com antibiótico específico (puromicina), e não apresentaram diferenças morfológicas ou proliferativas quando comparadas ao controle não transfectado (Figura 15).

Figura 15. Morfologia de linhagens de melanoma metastático humano SK-Mel-28 e SK-Mel-103 transfectadas com *RECK* em comparação com o controle não transfectado e com células transfectadas com o vetor pCXN2 sem o inserto de interesse. Não foram observadas diferenças morfológicas entre as culturas celulares antes e após a transfecção. Aumento: (A) 200x e (B) 400x.

Foram realizados ensaios de RT-PCR em tempo real e *Western Blot* para validar a superexpressão de RECK nas linhagens de melanoma analisadas (Figuras 16 e 17, respectivamente). Como controle positivo, utilizou-se uma linhagem de glioblastoma humano T98G com superexpressão de *RECK*. Entretanto, verificamos que a indução da superexpressão não foi bem sucedida, pois não foi encontrada diferença significativa quanto à expressão de *RECK* nas linhagens transfectadas em comparação ao controle não transfectado (Figuras 16 e 17).

Figura 16. Expressão gênica de RECK nas linhagens de melanoma metastático humano SK-Mel-28 e SK-Mel-103 após a transfecção em comparação com o controle não transfectado. Legenda: C: controle, células não transfectadas; V: células transfectadas com o vetor pCXN2 sem o inserto de interesse; e R: células transfectadas com pCXN2 contendo RECK. Não há diferença significativa entre as linhagens. Como controle endógeno, utilizou-se o gene *GAPDH*.

Figura 17. Expressão proteica de RECK nas populações selecionadas após a transfecção em comparação com o controle não transfectado. Legenda: C: controle, células não transfectadas; V: células transfectadas com o vetor pCXN2 sem o inserto de interesse; R: células transfectadas com pCXN2 contendo RECK; e +: glioblastoma T98G com superexpressão de RECK. Não há diferença entre as linhagens. Como controle endógeno, utilizou-se a proteína α - tubulina.

Assim, o sistema utilizado para superexpressão gênica por transfecção plasmidial não possibilitou a expressão de *RECK*, embora as populações tenham disso

selecionadas adequadamente. Como esse sistema induz a uma superexpressão transitória, utilizou-se o sistema lentiviral com o vetor FG12-CMV a fim de otimizar a superexpressão do gene de interesse. Após a confirmação do tamanho e da sequência do vetor e do inserto de cDNA de *RECK*, realizou-se a infecção lentiviral (1º Protocolo) para superexpressão desse gene em células de melanoma. Em seguida, a eficiência da infecção foi avaliada por citometria de fluxo, que detectou fluorescência de GFP no vetor lentiviral em 62,5% das células SK-Mel-28 infectadas com FG12-CMV sem o cDNA de *RECK*, em comparação a 29,2% das células SK-Mel-28 infectadas com FG12-CMV contendo *RECK*. Para a linhagem de melanoma SK-Mel-103, estes valores correspondem a 82,0% das células com FG12-CMV sem o cDNA de *RECK*, em comparação a 43,3% das células com FG12-CMV contendo *RECK*. A população foi, então, submetida a *sorting* por citometria de fluxo (sob supervisão da Professora Doutora Mari Cleide Sogayar, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, IQ – USP), porém tais culturas foram contaminadas com microorganismos, impossibilitando o enriquecimento da cultura de populações celulares contendo FG12-CMV e FG12-CMV-*RECK*.

Para melhorar a eficiência de infecção, o protocolo foi modificado (2º protocolo) e a eficiência da infecção foi aumentada, de modo que a fluorescência do vetor lentiviral foi detectada em 89,0% das células SK-Mel-28 infectadas com o vetor FG12-CMV vazio, em comparação a 58,1% das células SK-Mel-28 infectadas com FG12-CMV contendo o cDNA de *RECK*. Para a linhagem de melanoma SK-Mel-103, estes valores corresponderam a 94,7% das células com o vetor FG12-CMV vazio, em comparação a 65,8% para as células com FG12-CMV com cDNA de *RECK* (Figura 18). As diferenças entre ambos os protocolos foram descritas na Tabela 3 (Anexo 1). Realizou-se Real Time PCR a fim de validar os dados porém não houve variação da expressão gênica entre o controle e a cultura contendo o vetor de superexpressão de *RECK*. Mesmo após a mudança de protocolo de transfecção e infecção, a superexpressão não foi observada (dados não mostrados).

Figura 18. Morfologia de linhagens de melanoma metastático humano (A) SK-Mel-28 e (B) SK-Mel-103 infectadas com vetor lentiviral FG12-CMV com cDNA de RECK, em comparação com o controle não infectado e o controle infectado com o vetor vazio. Aumento: 200x.

4.4. Inibição da expressão de RECK em melanócitos normais humanos

Para investigar a influência de *RECK* sobre a tumorigênese do melanoma, a expressão desse gene foi inibida por shRNA em duas culturas primárias de melanócitos normais humanos (FM22 e FM305, pertencentes ao banco de células do Laboratório de Citopatologia, FCF-USP) e seu silenciamento foi validado por *Western Blot* (Figura 19). De acordo com a Figura 19, observa-se que a inibição da expressão de *RECK* em melanócitos foi eficiente, principalmente nas sequências shRNA 23, 24 e 26 para ambas as culturas celulares. Além disso, como esperado, os controles não interferiram na expressão de *RECK*. É importante salientar que a inibição induzida ocasionou aumento de tamanho da banda equivalente a 68 kDa.

Figura 19. Validação do silenciamento de *RECK* nas culturas de melanócitos humanos normais (FM22 e FM305) infectadas com diferentes sequências de shRNA *RECK* (23 a 27), em comparação com o controle infectado com o vetor sem o inserto de interesse (pLKO), o controle infectado com o vetor contendo uma sequência aleatória (pLKO scramble), e com a cultura de glioblastoma T98G humano com superexpressão de *RECK* (RECK+).

Quanto à morfologia celular, observa-se na Figura 20 que, para a cultura celular do melanócito FM22, as populações contendo as sequências referentes a R25, R26 e R27 apresentaram aspecto “fibroblastóide” quando comparados ao controle sem silenciamento; e, para os melanócitos FM305, as populações celulares R24 e R25 apresentaram aspecto mais arredondado e vacuolizado. Na Figura 21, observa-se que o silenciamento interferiu também na proliferação celular para as populações selecionadas R24, R25 e R26, que apresentaram inibição considerável do crescimento celular para ambas as culturas de melanócitos. Esse efeito foi ainda mais acentuado para os melanócitos FM305, já que as populações selecionadas R26 e R27 tornaram-se inviáveis uma semana e duas semanas após a infecção lentiviral, respectivamente, sendo que ao final desse período não foi possível a realização de ensaios funcionais de tumorigênese.

Figura 20. Morfologia das culturas de melanócitos humanos normais (FM22 e FM305) infectadas com diferentes sequências de shRNA *RECK* (R23 a R27), em comparação com o controle do vetor sem o inserto de interesse (pLKO) e o controle do vetor contendo uma sequência aleatória (pLKO scramble). Aumento: 200x para FM22, e 400x para FM305.

Figura 21. Curva de crescimento de culturas de melanócitos humanos normais (FM22 e FM305) infectados com diferentes sequências de shRNA *RECK* (R23 a R27), em comparação com o controle do vetor sem o inserto de interesse (pLKO) e o controle do vetor contendo uma sequência aleatória (pLKO scramble).

Na Figura 22, nota-se que a morfologia celular dos melanócitos FM22 e FM305 foi alterada após a inibição de *RECK* por shRNA, caracterizada pela redução no tamanho dos dendritos ao longo de cinco semanas.

Figura 22. Microfotografia de melanócitos normais humanos infectados com diferentes sequências de shRNA RECK (RECK 23 e RECK 24), uma e cinco semanas após a seleção das células infectadas, em comparação com o controle do vetor pLKO com uma sequência shRNA aleatória (pLKO scramble). Aumento: 100X.

A fim de comparar os resultados obtidos nos melanócitos com outra cultura não tumoral de células da pele, realizou-se a inibição da expressão de RECK por shRNA em fibroblastos humanos normais. Na Figura 23, nota-se que o silenciamento foi eficiente, já que a expressão de RECK em fibroblastos diminuiu drasticamente, apesar da proteína não ter sido totalmente inibida nas populações selecionadas. Além disso, como esperado, o controle do vetor pKLO scramble não interferiu na expressão de RECK.

Figura 23. Validação do silenciamento de RECK em cultura de fibroblastos humanos normais FP51 infectada com diferentes sequências de shRNA RECK (23 a 27), em comparação com o controle de células sem o vetor (FP) e o controle do vetor com uma sequência aleatória (pLKO scramble).

O silenciamento de RECK em fibroblastos não interferiu na proliferação celular, já que não houve diferença entre as curvas de crescimento dos diferentes grupos experimentais, apresentada na Figura 24. O silenciamento foi realizado em duplicata, em culturas primárias isoladas de fibroblastos.

Figura 24. Curva de crescimento de fibroblastos humanos normais FP51 infectados com diferentes sequências de shRNA RECK (R23 a 27), em comparação com o controle do vetor sem o inserto de interesse (pLKO) e o controle do vetor com uma sequência aleatória (pLKO scramble).

5. DISCUSSÃO

O gene RECK, cujo promotor é regulado pelo gene RAS, codifica para uma proteína ancorada à membrana que está envolvida em vários processos fisiológicos, incluindo a regulação da integridade da matriz e, em alguns sistemas celulares, pode influenciar a ação de MMPs (Noda & Takahashi, 2007; Jeon et al., 2011). A expressão de RECK é frequentemente silenciada em células tumorais e este gene é um alvo comum de hipermetilação do promotor (Chan et al., 2007; Zhang et al., 2012). Apesar dos efeitos documentados de RECK sobre o comportamento de células tumorais, as vias de sinalização controladas por ele e todos os mecanismos específicos pelos quais este gene modula a formação de metástases ainda permanecem desconhecidos.

Neste capítulo, foram apresentados os resultados referentes à expressão basal gênica e proteica de RECK, que foram comparados em um painel de linhagens de melanoma e amostras de biópsias de pacientes, utilizando-se culturas primárias de melanócitos e fibroblastos normais humanos como controle. A morfologia culturas celulares de melanoma metastático humano, que se mostrou diferente entre as linhagens, demonstra que cada perfil de mutação pode influenciar o fenótipo celular.

Nas linhagens celulares de melanoma e nas amostras de melanoma cutâneo primárias, a expressão gênica de RECK não foi homogênea. A expressão gênica basal de RECK verificada nas linhagens utilizadas, tanto nas amostras de células do Laboratório de Citopatologia (FCF-USP) quanto nas amostras de pacientes cedidas pela Professora Ana Krepischi (IB-USP), apresentaram diferentes perfis de expressão que podem não estar ligados diretamente a malignidade, visto que há diferença de expressão entre as células tumorais, e, ainda, muitas células de melanoma atingiram níveis similares ou inferiores a expressão de células normais, como melanócitos. Nas linhagens de melanoma, somente a linhagem UACC-62 apresentou expressão significativamente superior à expressão gênica basal de RECK em melanócitos humanos normais. Vale ressaltar que, dentre as linhagens de melanoma, a UACC-62 é a única que apresenta inibição de p16, segundo tabela de padronização das linhagens do Laboratório de Citopatologia Clínica (FCF – USP). Além disso, como esperado, houve significativa expressão gênica de RECK em fibroblastos, marcadores clássicos de expressão dessa proteína (Takahashi et al. 1998).

Ao correlacionar com a expressão de RECK em melanoma de amostras de pacientes, somente quatro das 20 amostras de melanoma primário apresentadas (20%) apresentaram alta expressão gênica de RECK. As outras amostras apresentaram expressão igual ou inferior àquela encontrada em melanócitos humanos normais, sugerindo seu papel de supressor tumoral. A expressão de RECK pode estar sendo influenciada por parâmetros de proliferação celular, capacidade invasiva, aquisição de fatores de EMT, entre outros. Além de controlar os mecanismos de invasão e migração celular, já foi relatado que RECK também pode influenciar as vias de sobrevivência de RAS/PI3K e de proliferação celular. A inibição de RECK é capaz de induzir o aumento transitório da proteína quinase AKT e a fosforilação de ERK, associado a superexpressão de ciclina D1, p19, p53 e p21, indicando que a depleção de RECK leva a um *feedback* negativo para a sinalização de RAS e senescência celular subsequente (Kitajima et al. 2011; Han et al. 2012; Xue et al. 2014).

Embora tenha sido possível detectar a expressão gênica de RECK nas linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-103, o mesmo não foi possível no que se refere à expressão proteica basal de RECK, sugerindo um mecanismo de inibição pós-transcricional.

A importância dos processos epigenéticos no desenvolvimento do câncer tem sido fortemente enfatizada pelo crescente número de trabalhos relatando falhas tanto nos processos de metilação global do DNA quanto de modificações de histona em diversos tipos tumorais (Vidanes et al. 2005; Schinke et al. 2010; Chang et al. 2011; Mori et al. 2011; Shukla & Meeran 2014). Atualmente, já foram descritos muitos agentes capazes de interferir na ação de enzimas que alteram a metilação de DNA ou a modificação de histona, como 5-aza-dC e TSA, respectivamente (de Souza et al. 2012; Rajaii et al. 2014; Woods et al. 2015). Porém, ainda não se conhecem os mecanismos que guiam essas enzimas para sítios específicos do genoma, por isso essas drogas têm sido pesquisadas no intuito de reverter alterações globais (de Souza et al. 2012; Rajaii et al. 2014; Woods et al. 2015). Muitos trabalhos, ao utilizarem 5-aza-dC, foram capazes de resgatar a expressão de RECK nas linhagens avaliadas (Chang et al. 2006; Zhou et al. 2015; Zhou et al. 2014). De acordo com nossos resultados, pode-se inferir que a expressão gênica de RECK é regulada por DNA MTases, visto que a utilização de 5-aza-dC, inibidor dessas enzimas, foi capaz de resgatar a expressão gênica de RECK. Porém, a inibição da metilação global do DNA não foi suficiente para induzir sua expressão proteica nas linhagens analisadas.

Tentamos, ainda, sem sucesso, superexpressar RECK utilizando-se vetores de expressão tanto plasmidial quanto lentiviral pelo silenciamento gênico. Embora a seleção das populações contendo o vetor plasmidial foi eficiente, demonstrando que o mesmo foi inserido corretamente dentro das células tumorais, a superexpressão de RECK não foi observada. Ao analisarmos a superexpressão pelo vetor lentiviral FG12, a seleção das células não foi eficiente e, portanto, o ensaio de validação não foi confiável.

Dados do nosso grupo demonstraram que o antitumoral vemurafenibe, um inibidor da via de RAS, foi capaz de resgatar a expressão gênica de RECK, somente nas células tratadas e naquelas que adquiriam resistência a esse inibidor de BRAF. Nesse caso, a expressão de RECK está intimamente ligada a invasividade e proliferação das células que adquiriram quimiorresistência a este quimioterápico (Sandri et al., artigo em preparação).

Assim, considerando que a superexpressão por modulação epigenética ou por vetores de expressão não foi capaz de aumentar a expressão de RECK em células tumorais de melanoma, a técnica de shRNA foi utilizada para inibição do gene RECK em células normais da pele humana. Para isso, melanócitos e fibroblastos humanos

normais foram utilizados como controle, já que dados da literatura indicam que essas células possuem maior expressão gênica e proteica de RECK (Takahashi et al. 1998; Noda et al., 2003). No entanto, nesse estudo, as células de melanócitos não apresentaram desempenho satisfatório como controle, já que apresentaram expressão gênica e proteica similar às células de melanoma, sugerindo que a expressão de RECK permaneça muito próxima da expressão basal do melanócito. Entretanto, a inibição de RECK em melanócitos alterou a formação de dendritos, modificando morfologia celular dessas células, e interferiu no crescimento celular, demonstrando seu papel regulador da proliferação na biologia dos melanócitos.

Por outro lado, o uso dos fibroblastos como controle foi bem sucedido, já que essas células apresentaram altos níveis constitutivos de RECK, os quais foram drasticamente reduzidos após a inibição por shRNA. Porém, os fibroblastos não apresentaram alteração quanto ao crescimento celular, evidenciando que a regulação de RECK sobre a proliferação celular pode ser exclusiva em melanócitos.

Embora preliminares, nossos dados foram essenciais para a descoberta de outros mecanismos de RECK na biologia do melanoma, como a regulação da expressão gênica por fenômenos não ligados a metilação e sua ativação gênica e proteica por inibidores de BRAF.

6. CONCLUSÃO

A expressão de RECK em células tumorais não é homogênea e não está, diretamente, associada ao seu potencial antitumoral.

O protocolo de inibição da metilação global do DNA em células tumorais não foi capaz de aumentar a expressão proteica de RECK, embora a expressão em níveis transcricionais tenha sido relevante, sugerindo-se, portanto, outros mecanismos de inibição independentes de marcas epigenéticas associadas ao silenciamento gênico.

A inibição do gene RECK em melanócitos interferiu negativamente na proliferação celular e alterou a morfologia dessas células.

CAPÍTULO 2

Papel de RECK na heterogeneidade tumoral clonal em melanoma metastático humano

1. INTRODUÇÃO: Heterogeneidade tumoral clonal em melanoma

O melanoma é, acima de tudo, uma doença genética complexa. O conjunto de mutações-chave associado à inibição de supressores tumorais e à seleção pelo microambiente determina qual fenótipo será refratário às terapias de escolha (Gallagher et al. 2005; Smalley 2013; Becker et al. 2014; Rizos et al. 2014). Por isso, identificar os parâmetros que levam a composição e seleção da população tumoral inicial pode ser uma abordagem interessante para conter a progressão do melanoma (Gray-Schopfer et al. 2007; Tsao et al. 2012).

Muitos trabalhos consideram que a população tumoral inicial é oriunda de uma única célula transformada que adquiriu parâmetros de malignidade, e passa a responder de forma diferenciada à evasão de morte celular programada, inibição de resposta de homeostase por contato célula-célula ou célula-matriz extracelular, maior invasividade, maior migração, produção de fatores de crescimento e de transição epitélio-mesenquimal (EMT) (Nowell 1976; Marusyk & Polyak 2011). A partir disso, essa célula, de acordo com sua interação com microambiente, começa a proliferar gerando, assim, a população tumoral inicial (Hoek et al. 2008; Marusyk & Polyak 2011; Anaka et al. 2013). Essa população tumoral inicial pode ser homogênea ou heterogênea, quanto a progressão tumoral ou ao perfil de resposta ao tratamento, conforme esquema apresentado na Figura 25.

O tumor é denominado homogêneo quando todas suas células filhas apresentam o mesmo fenótipo da célula-mãe (Marusyk & Polyak 2011); ou heterogêneo, no qual há subpopulações tumorais distintas fenotipicamente da célula-mãe (Nowell 1976; Marusyk & Polyak 2011; Gerlinger et al. 2014). Nesse último caso, a população parental nada mais é do que um conjunto de subpopulações tumorais clonais. As populações podem ser heterogêneas inter ou intratumorais. A heterogeneidade tumoral pode ser genética, quando os subclones apresentam perfil genético diferente da população parental; ou não genética, quando o fenótipo distinto não está atrelado a qualquer alteração no genoma da célula parental (Brock et al. 2009; Capp 2010; Greaves & Maley 2012). No mesmo sítio tumoral, também é possível encontrar populações clonais homogêneas e heterogêneas entre si, separadas ou não por barreiras físicas, como vasos sanguíneos e outros elementos presentes na matriz extracelular (Fukunaga-Kalabis et al. 2011; Swanton 2012; Gerlinger et al. 2014).

A heterogeneidade é uma das principais causas da quimiorresistência tumoral (Gerlinger & Swanton 2010; Dobbin et al. 2014). Tratamentos combinatórios podem ser utilizados para conter as diversas populações presentes no tumor inicial, porém o estudo da composição celular da massa tumoral poderia aprimorar as abordagens terapêuticas utilizadas (Ding et al. 2013; Stepanenko et al. 2013; Gerlinger et al. 2014).

As teorias mais aceitas em como as populações heterogêneas são originadas, são as de seleção clonal e de diferenciação de células tronco tumorais. Na heterogeneidade tumoral por seleção clonal, a população tumoral é composta de subpopulações tumorais clonais, na qual cada subpopulação é resultante de um clone tumoral que sofreu mutação e foi selecionado a partir de um evento estocástico ou por mudanças do microambiente ao longo do tempo (Nowell 1976; Greaves & Maley 2012; Ding et al. 2013; Shi et al. 2014). Possivelmente, essas subpopulações se originam de uma única vez, a partir de um melanócito transformado, ou de um ou mais clones tumorais diferentes do melanócito transformado previamente presentes. Ou seja, essa seleção pode ocorrer uma única vez ou sucessivas vezes ao longo da progressão neoplásica. Assim, essa seleção segue o mesmo padrão de seleção darwiniana, na qual a instabilidade genômica é utilizada para a seleção pelo microambiente tumoral (Nowell 1976; Merlo et al. 2006; Greaves & Maley 2012; Feigelson et al. 2014).

Já a heterogeneidade tumoral por diferenciação de células tronco tumorais também considera que a população tumoral final é resultante de subpopulações tumorais clonais diferentes, porém cada clone partiu da diferenciação de uma única célula tronco tumoral (do inglês: *cancer stem cell*, ou CSC) inicial (Magee et al. 2012; Meacham & Morrison 2013; Sugihara & Saya 2013). Nesse modelo, as células filhas dão origem a clones tumorais e somente as CSCs tem a capacidade de gerar células malignas distintas entre si, devido ao seu perfil pluripotente (Meacham & Morrison 2013). Como as CSCs aparecem na população inicial é ainda um enigma. Em melanomas, discute-se que elas, na verdade, sejam as células precursoras que darão origem aos melanoblastos e melanócitos ou, ainda, tratam-se de melanócitos que sofreram desdiferenciação celular (Marusyk & Polyak 2011; Magee et al. 2012; Sugihara & Saya 2013; Shukla & Meeran 2014).

Afirma-se que, para melanoma, os clones tumorais adquirem temporariamente características de células tronco, que são reguladas pelo microambiente tumoral (Zabierowski & Herlyn 2008; Hoek & Goding 2010; Li et al. 2015). Esse perfil

pluripotente é dinâmico, através da mudança de perfil proliferativo para invasivo, de acordo com os fatores de crescimento presentes no meio (Anderson et al. 2006; Fukunaga-Kalabis et al. 2011). Sendo assim, qualquer subclone seria capaz de sofrer desdiferenciação, tornando todas as subpopulações clonais potencialmente metastáticas e quimiorresistentes, por exemplo (Hoek et al. 2008; Li et al. 2015).

A pré-existência de subpopulações clonais resistentes dentro de uma única massa tumoral inicial pode ser determinante na extinção de ou na adaptação evolucionária tumoral (Meacham & Morrison 2013). Nesse contexto, a pesquisa de marcadores moleculares tumorais que identifiquem esses subclones mostra-se extremamente necessária a fim de identificar precocemente lesões quimiorresistentes e metastáticas nos pacientes com melanoma, visando a melhoria da abordagem terapêutica e a possível redução da quimiorresistência (Paraiso et al. 2010; Roesch et al. 2010; Li et al. 2015)

A proliferação e a invasão celulares são dois fenômenos muito importantes na aquisição de resistência e manutenção da heterogeneidade tumoral (Khodadoust et al. 2009; Stepanenko et al. 2013). Já foi relatado no trabalho de Roesch et al. (2010) que a heterogeneidade tumoral é mantida por subpopulações clonais pouco proliferativas, presentes em culturas de melanoma, que adquirem características invasivas dependendo da regulação do microambiente (Roesch et al. 2010; Stepanenko et al. 2013).

Tendo em mente a heterogeneidade tumoral do melanoma, faz-se necessária a busca de estratégias terapêuticas mais eficientes e o estudo de mecanismos que possam elucidar o processo de transformação maligna e progressão tumoral (Rebecca & Smalley 2011; Anaka et al. 2013). A identificação da composição das subpopulações presentes no tumor inicial pode ser especialmente importante na predição de respostas a mudanças dramáticas no microambiente, tais como aquelas induzidas pela terapia antitumoral (Roesch et al. 2010; Shi et al. 2014).

Sendo assim, decidimos modelar nossos estudos para investigar como RECK estaria expresso no processo de heterogeneidade tumoral. Para isso, abordamos diversos parâmetros de malignidade, como motilidade, invasão, proliferação, controle de morte celular e sensibilidade ao inibidor de BRAF, vemurafenibe. Fizemos uma caracterização in vitro da heterogeneidade tumoral clonal em melanoma nas linhagens celulares utilizadas, a fim de uma abordagem mais abrangente da heterogeneidade tumoral clonal em melanoma.

Figura 25. A população tumoral inicial pode ser homogênea ou heterogênea, quanto à progressão tumoral ou ao perfil de resposta ao tratamento.

Fonte: Adaptado de Marusyk & Polyak 2011.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi o modelamento in vitro da heterogeneidade tumoral clonal, através do isolamento de subpopulações clonas a partir de uma população tumoral inicial, e caracterização desses subclones quanto aos eventos de proliferação, indução de morte celular, motilidade e invasão, na ausência ou presença do antitumoral vemurafenibe. Nesse trabalho, identificamos o quanto essas subpopulações clonais se assemelham-se à população tumoral inicial e à cultura celular de melanoma resistente a vemurafenibe.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens tumorais

As linhagens de melanoma metastático humano WM164 e A375, pertencentes ao banco de células do Professor Doutor Keyran Smalley (Moffit Cancer Center, Tampa, FL, USA) e suas respectivas subpopulações clonais isoladas de forma não seletiva foram mantidas em meio RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 5% de soro fetal de bovino (SFB - Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e antibióticos. As culturas celulares foram cultivadas nas mesmas condições descritas no item Material e Métodos do Capítulo 1 desta tese.

3.2. Isolamento de subpopulações clonais de melanoma a partir de linhagens parentais

As subpopulações clonais de melanoma foram isoladas a partir das linhagens tumorais iniciais (parentais / *naïve*) de melanoma WM164 ou A375, e foram divididas em duas subcategorias:

- 1) Subpopulações clonais parentais / *naïve* isoladas estocasticamente a partir da linhagem parental: as culturas celulares *naïve* foram plaqueadas em uma placa de 96 poços, numa concentração de uma célula por poço (200 µL/poço). Poços contendo mais de uma ou nenhuma célula foram descartados. Então, após atingirem confluência, cada subpopulação clonal,

originária de uma célula única, foi tripsinizada e cultivada separadamente (Figura 33). As subpopulações clonais *naïve* isoladas a partir da linhagem parental WM164 foram denominadas WM164 CI (clone 1) e WM164 CII (clone 2) e as subpopulações isoladas a partir da linhagem parental A375, A375 C1 a A375 C8 (clones 1 a 8), conforme Figura 26.

- 2) Subpopulações de células de melanoma resistentes ao quimioterápico vemurafenibe foram obtidas por meio do tratamento continuado da linhagem parental da seguinte forma: as culturas celulares de melanoma parental foram plaqueadas e, após atingirem confluência de 30-40%, foram tratadas com doses crescentes (de 0,5 a 4,5 μM) de vemurafenibe (PLX4032) por 4 a 6 semanas, a cada 3 dias. A subpopulação de células quimiorresistentes isoladas a partir da linhagem parental WM164 foi denominada WM164R e a subpopulação isolada a partir da linhagem parental A375 foi chamada A375R. As linhagens quimiorresistentes foram mantidas na presença de 2 μM e 4,5 μM de vemurafenibe, respectivamente.

Figura 26. Isolamento estocástico de subpopulações tumorais clonais, a partir da linhagem tumoral parental.

3.3. Identificação da linhagem celular original por short tandem repeat (STR)

A identificação da linhagem parental inicial que originou as subpopulações clonais foi analisada pelo ensaio de *fingerprint* digital de DNA, realizado pela empresa Bio-Synthesis, Inc. (Texas, EUA). Para isso, o DNA da linhagem parental, juntamente com suas respectivas subpopulações clonais, foi isolado e os loci gênicos foram amplificados e identificados, segundo o padrão de *short tandem repeat*. Os loci gênicos avaliados foram: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, SVA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818, e FGA, a partir do cromossomo X. As subpopulações clonais que apresentaram os mesmos loci gênicos que a linhagem parental foram identificados como pertencentes da respectiva população parental inicial.

3.4. Tratamento com vemurafenibe

As linhagens parentais de melanoma e suas respectivas subpopulações clonais foram tratadas com vemurafenibe (PLX 4032, Selleckchem, EUA) durante 48 ou 72 horas, para a maioria dos ensaios. Os subclones foram, em alguns ensaios, comparados com a cultura celular de melanoma WM164 ou A375 resistentes a vemurafenibe. A geração dessas populações quimiorresistentes foi realizada de acordo com Nazarian et al. (2010). Essas células resistentes foram, então denominadas, WM164R e A375R.

3.5. Curva de crescimento e viabilidade celular pelo ensaio de MTT

Para o ensaio de curva de crescimento, as linhagens parentais de melanoma e suas respectivas subpopulações clonais foram plaqueadas em placas de 96 poços e quantificadas 24 a 96 horas após o plaqueamento. Para o ensaio de viabilidade celular, as culturas foram tratadas com diferentes doses de vemurafenibe por 72 horas. Tanto o ensaio de curva de crescimento quanto o ensaio de viabilidade celular foram realizados nas mesmas condições descritas para o ensaio de viabilidade por MTT no item Material e Métodos do Capítulo 1 desta tese.

3.6. Proliferação celular pelo ensaio de Cell Track™ CFSE Kit

As linhagens parentais de melanoma e suas respectivas subpopulações clonais foram plaqueadas e sua proliferação foi avaliada diariamente à partir de 24 horas, até 96 horas após o plaqueamento por citometria de fluxo, através do ensaio de Cell Track™ CFSE (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, Thermo Fisher), conforme instruções do fabricante. As células foram marcadas no momento do plaqueamento e a fluorescência de CFSE foi decaindo ao longo do tempo. Utilizou-se o valor da mediana de fluorescência para a elaboração dos gráficos.

3.7. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo

Para a realização do ensaio, foram cultivadas 6×10^4 células/3 mL por poço, em placas de 6 poços. Após atingirem aproximadamente 50% de confluência, em média 24 horas após o plaqueamento, o meio de cultivo foi retirado e, então, adicionou-se meio contendo vemurafenibe nas concentrações entre 1 e 3 μM . Após 48h de tratamento, as células foram coletadas, lavadas uma vez com PBS.A e lisadas com 300 μL /amostra de tampão de lise (Triton X-100 0,1%, citrato de sódio 0,1%, 0,02 mg/mL de iodeto de propídio e RNase A 25 mg/mL em PBS.A). Após 30 minutos de incubação a 37°C, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, para identificação de todas as fases do ciclo celular. Utilizaram-se os softwares FlowJo™ e Microsoft Excel® para a confecção dos gráficos.

3.8. Senescência celular por coloração com β -galactosidade

Foram cultivadas 6×10^4 células/3 mL por poço, em placas de 6 poços. Após atingirem aproximadamente 50% de confluência, o meio de cultivo foi trocado e adicionou-se meio contendo vemurafenibe nas concentrações entre 0,3 e 3 μM . Após 72h de tratamento, as células foram coletadas, lavadas uma vez com PBS.A, fixadas em solução de formalina 10% em PBS por 30 min, e incubadas overnight com 1 mL/poço da solução preparada para avaliação da senescência, protegidas da luz e da presença de CO₂, a 37°C. A solução para avaliação da senescência é composta por 1 mL de 50

mg/mL de X-galactosidade diluída em DMSO, 4 mL de 40 mM ácido cítrico/fosfato sódico (tampão fosfato) pH 6,00, 1 mL de 100 mM $K_4Fe(CN)_6$, 1mL de 100 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,6 mL de 5 M NaCl e 40 μ L de 1 M $MgCl_2$. Após o período de incubação, a solução para avaliação da senescência foi descartada, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de glicerol 70% em PBS. As células coradas em azul foram contadas e fotografadas por microscopia óptica.

3.9. Ensaio de migração celular por “ferida”

Foram cultivadas 10^5 células/3 mL por poço, em placas de 6 poços. Após atingirem aproximadamente 90% de confluência (24 horas após o cultivo), realizou-se uma “ferida” ou “arranhão” na cultura celular, com o auxílio de um ponteira de micropipeta. O poço foi lavado 3x com PBS. A, para retirar as células que desaderiram e adicionou-se meio de cultivo contendo vemurafenibe nas concentrações de 3 μ M. Observou-se a migração celular a cada duas horas, e foram fotografadas por microscopia óptica. O experimento foi cessado quando o controle não tratado apresentou a “ferida” fechada.

3.10. Expressão gênica por Real Time PCR

A expressão gênica das linhagens de melanoma parental e suas respectivas subpopulações clonais foi avaliada por Real Time PCR, utilizando-se Taqman® Master Mix e Real-Time PCR Assays (Thermo Fisher) pré-sintetizados para MMP-1 (Hs00899658_m1) e MMP-2 (Hs01548727_m1) humanos. Utilizou-se, por reação, 1 μ L de cDNA não diluído para cada 9 μ L de mix, composto de 3,5 μ L de água MilliQ (Millipore) livre de nucleases, 0,5 μ L de Assay 20X e 5 μ L de Taqman Universal Master Mix II with UNG (Thermo Fisher). O procedimento de extração de RNA, síntese de cDNA e escolha do gene endógeno seguiu os mesmos parâmetros descritos no item Material e Métodos do Capítulo 1 desta tese.

3.11. Expressão proteica por Western Blot

A expressão proteica das linhagens parentais de melanoma e suas respectivas subpopulações clonais foi avaliada conforme descrito no item Material e Métodos do

Capítulo 1. Os anticorpos para *Western Blot* utilizados no Capítulo 2 foram: anti-pRb (Cell Signaling), anti-Rb total (Cell Signaling), anti-CDK4 (Cell Signaling), anti-ciclina D1 (Cell Signaling), anti-GAPDH (Sigma), anti-p44/42 MAPK (Cell Signaling), anti-ERK total (Cell Signaling), anti-pAKT Thr308 (Cell Signaling), anti-pAKT Ser473 (Cell Signaling), anti-AKT total (Cell Signaling), anti-pBAD (Cell Signaling), anti-BAD total (Cell Signaling), anti-BIM (Cell Signaling), anti-Mcl-1 (Cell Signaling).

3.12. Avaliação da sobrevivência celular por ensaio clonogênico

O protocolo descrito por Franken et al. (2006) foi utilizado para a realização deste ensaio, brevemente descrito a seguir:

As células foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 500 células/placa de 60 mm. As culturas celulares foram cultivadas por 3 semanas e tratadas a cada dois dias. Após a condição controle sem tratamento atingir 90% de confluência, as células foram fixadas em solução contendo formaldeído a 4% em PBS e coradas com uma solução contendo 2% de cristal violeta em etanol a 0,2%. Após este período, o sobrenadante foi descartado e as colônias foram fotografadas e analisadas.

3.13. Caracterização de morte celular do tipo apoptose por citometria de fluxo

Para o ensaio, utilizou-se marcação celular com os fluoróforos Anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP), no qual, através de marcação dupla, é possível diferenciar células em apoptose, necrose ou apoptose tardia/necrose. Células que possuem membrana celular íntegra apresentando o receptor para fosfatidilserina incorporam o fluoróforo Anexina V-FITC, sugerindo processo apoptótico, enquanto que o iodeto de propídio é incorporado por células que apresentam ácidos nucleicos expostos, ou seja, rompimento da membrana celular, o que sugere processo necrótico. Dupla marcação sugere processo apoptótico tardio ou necrose com exposição do receptor de fosfatidilserina. Células viáveis, ou seja, que não apresentam a externalização do receptor e possuem membrana celular íntegra, não apresentam incorporam fluoróforo (Demchenko 2012).

Para a realização do ensaio, as células foram cultivadas e, após atingirem aproximadamente 50% de confluência, tratadas com 3 μ M de vemurafenibe por 72 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS e uma vez com tampão de ligação (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$). As células foram então ressuspensas em 100 μ L de tampão de ligação contendo Anexina V-FITC na diluição 1:500 e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Acrescentou-se 400 μ L de tampão de ligação e, no caso de marcação dupla com iodeto de propídio (IP), adicionou-se às células 40 μ L de solução de IP (100 μ g/mL em tampão de ligação). As amostras foram analisadas imediatamente em citômetro de fluxo no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP. Utilizaram-se os softwares FlowJo™ e Microsoft Excel® para a confecção dos gráficos.

3.14. Crescimento celular independente de ancoragem sobre “cama” de agarose

Para a realização deste ensaio, foram adicionados inicialmente 100 μ L/poço de solução de ágar 1,5% aquecido (37°C) em placa de 96 poços. Após solidificação do ágar, foram adicionados 5×10^3 células/100 μ L de meio em cada poço. As células foram incubadas em atmosfera úmida a 37°C contendo 5% de CO_2 por 72h, para observação de micro esferoide tumoral. O crescimento celular foi analisado por microscopia óptica.

3.15. Viabilidade celular em cultura tridimensional de esferoide tumoral tridimensional

Os micro esferoides oriundos do ensaio de soft ágar foram coletados com auxílio de pipeta Pasteur de plástico descartável e plaqueados em solução de colágeno I conforme descrito anteriormente em trabalho publicado pelo grupo (Tiago et al. 2014). No dia seguinte ao plaqueamento, os esferoides foram tratados com vemurafenibe por 72 horas e sua viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio LIVE/DEAD® Cell Viability/Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher), como descrito por Smalley & Lioni (2006).

3.16. Expressão de fatores de EMT por stem cell-ness array

O ensaio de expressão proteica de fatores ligados a EMT foi realizado pela Dr. Fernanda Faião-Flores (Laboratório de Citopatologia, FCF – USP) utilizando o kit comercial Human Pluripotent Stem Cell Array (R&D System), segundo orientações do fabricante. Trezentos microgramas de lise celular de cada cultura celular foram utilizadas por membrana, para avaliação da expressão proteica.

3.17. Pele reconstruída in vitro

O modelo de invasão tumoral em ambiente 3D - pele humana reconstruída (PHR) foi desenvolvido conforme trabalhos publicados anteriormente pelo grupo com pequenas alterações (Brohem et al. 2012; Zanoni et al. 2014; Pennacchi et al. 2015). Brevemente, fibroblastos normais humanos ($1,5 \times 10^4$ células/pele) foram imersos em uma matriz de colágeno tipo I e, após a polimerização desta matriz dérmica, foram semeados queratinócitos ($2,5 \times 10^4$ células /pele), melanócitos ($0,83 \times 10^4$ células/pele) e células de melanoma WM164 parental ou suas respectivas subpopulações clonais (WM164 CI, WM164 CII e WM164R – quimiorresistente) ($8,3 \times 10^4$ células/pele). As PHRs foram mantidas submersas por 24 horas para adesão celular e após este período foram transferidas para interface ar-líquido de forma a promover a diferenciação epitelial. As peles contendo células de melanoma WM164R receberam tratamento com vemurafenibe ($3\mu\text{M}$) a cada 72 horas e os demais grupos experimentais “tratados” receberam o agente apenas nos últimos 5 dias do período de cultivo.

3.18. Imuno-histoquímica em pele reconstruída in vitro

Após o período de cultivo das PHRs contendo células de melanoma WM164 parental e suas respectivas subpopulações clonais (CI e CII) e quimiorresistentes (WM164R), estas foram fixadas em formalina tamponada 10% à 4°C e processadas para inclusão em parafina histológica. Secções de 5µm foram cortadas em micrótomo no Setor de Técnicas Histológicas do ICB-USP e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análise quanto à morfologia.

3.19. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e analisados estatisticamente, utilizando-se o software GraphPad Prism 5, pelo teste One-way analysis of variance (ANOVA), com valor de significância de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Comprovação da heterogeneidade tumoral da população parental inicial

Considerando que os tumores são constituídos por populações heterogêneas de células, buscamos avaliar se dentro da mesma linhagem de melanoma metastático humano (WM164 parental ou A375 parental) essa heterogeneidade também estava presente.

As culturas de subpopulações clonais a partir da cultura de uma única célula isolada da população parental (WM164 ou A375) foram estabelecidas e foram avaliadas, duas e oito subpopulações clonais, a partir dos subclones isolados das linhagens tumorais parentais WM164 e A375, respectivamente. Para a linhagem WM164, as subpopulação clonais foram denominadas CI e CII (Figura 27) e para A375, C1 a C8 (Anexo II). Nem todas as células isoladas inicialmente a partir da população parental conseguiram progredir e proliferar com eficiência (dados não mostrados), o que indica que essas subpopulações provavelmente eram dependentes das demais para progredir. Comparamos também a população parental e os subclones gerados da mesma linhagem celular, porém com resistência induzida ao quimioterápico vemurafenibe (PLX4032), essa linhagem quimioresistente foi chamada WM164R.

A origem parental das subpopulações clonais foi atestada através de análise sequenciamento de sequências pequenas de DNA repetidas em série (*short tandem repeat* – STR, também denominados microssatélites) em comparação ao padrão de *loci* da linhagem celular parental. Não foi identificado nenhum tipo de contaminação por outra linhagem celular e todos os subclones apresentaram-se idênticos à linhagem parental (Apêndice II).

Uma vez que os subclones se mostraram idênticos à população parental, passamos a investigar outros parâmetros de malignidade, a fim de caracterizar a

heterogeneidade, tumoral. Quanto à morfologia celular, as subpopulações clonais de melanoma não apresentaram nenhuma diferença morfológica quando comparadas à população parental para as duas linhagens de melanoma parentais analisadas (Figura 27). Particularmente para a subpopulação clonal A375 C8, observou-se aparentemente maior citoplasma, quando observada por microscopia óptica (Anexo II).

Figura 27. Morfologia celular das subpopulações clonais oriundas de melanoma metastático humano WM164 (parental). Aumento: 100 e 200x.

Seguimos a caracterização das subpopulações clonais, avaliando-se diferentes perfis celulares. Interessantemente, a curva de crescimento das subpopulações clonais, avaliada pelo ensaio de MTT, demonstrou que os subclones apresentaram perfis proliferativos heterogêneos entre si e diferentes da linhagem parental (Figura 28A). A linhagem celular WM164 e, as subpopulações clonais CI e CII apresentaram taxas de crescimento celulares distintas, evidenciando o perfil pleiotrópico intrínseco presente na linhagem parental heterogênea (Figura 28A). Os mesmos resultados foram obtidos para a linhagem A375 (Anexo II).

Devido aos resultados para crescimento celular, avaliou-se também o ciclo celular das subpopulações clonais, comparadas com a linhagem parental. Após análise do ciclo por 72 horas, foi possível identificar maior fase G2/M (32%) no clone WM164

CI, enquanto não houve alteração do ciclo para WM164 CII, comparado com a linhagem parental (Figura 28B).

Para avaliar se os perfis apresentados pelas curvas de crescimento celular acarretariam em uma proliferação celular distinta entre os subclones, avaliou-se também o perfil proliferativo das subpopulações clonais de WM164 a partir do ensaio de CSFE (Figura 35C). Foi possível observar que o clone WM164 CI apresentou maior decaimento (42,85%) de CSFE a partir de 24 horas após o plaqueamento, quando comparada a linhagem parental e ao clone WM164 CII (Figura 28D), o que significa que houve maior proliferação de CI comparado-se com WM164 CII e a cultura parental correspondente (WM164 Parental). É interessante ressaltar que a subpopulação resistente ao vemurafenibe - WM164R - apresentou significativo decaimento de CSFE (23,2%) nas primeiras 24 horas (Figura 28C), porém esse decaimento passou a ser menos evidente com o passar do tempo, o qual avaliamos até 96 horas após o plaqueamento. A subpopulação clonal WM164 CII apresentou o mesmo perfil de decaimento de CSFE que a linhagem parental WM164. Não houve diferença significativa entre as culturas celulares de WM164R tratadas e não tratadas com vemurafenibe (dados não mostrados).

Já é sabido que muitas células, na aquisição da malignidade, começam a expressar proteínas relacionadas à capacidade de pluripotência celular. Por isso, avaliamos a expressão de proteínas relacionadas à característica tronco celular, pelo ensaio de *Stem cell-ness array* (Figura 29). O clone WM164 CII apresentou maior expressão de *Snail* (12%), marcador de EMT, enquanto CI apresentou maior expressão de OTX-2 (18,8%) (Figura 36). É importante salientar que GATA-4 foi inibido (27%) no clone resistente - WM164R (Figura 29), como principais resultados deste ensaio.

Visto que os processos de invasão e migração estão intimamente ligados, avaliamos também a capacidade de invasão e migração celulares pelo ensaio de transwell e ferida, respectivamente (Figuras 30A e 30B). O clone WM164 CI apresentou maior capacidade de invasão em câmara de Boyden comparado às outras linhagens celulares. (Figura 30A). Para migração celular, os clones WM164 CI e CII apresentaram maior capacidade de migração (98% e 90%, respectivamente), visto maior fechamento da ferida, comparado as outras linhagens WM164 (Figura 30B). É interessante observar que o clone resistente WM164R não apresentou perfil migratório nas condições testadas (Figura 30B).

A proliferação de clones tumorais sem a dependência de ancoragem à matriz extracelular foi analisada pela independência de ancoragem (Figura 31). Neste ensaio, ambas as subpopulações clonais WM164 CI e CII apresentaram rápido crescimento celular independentemente de ancoragem, assim como as linhagens parental e a resistente. No entanto, a subpopulação clonal WM164 CII apresentou visualmente esferoides menores e em maior quantidade quando comparados à linhagem parental WM164 (Figura 38). Todavia, a subpopulação clonal WM164 CI não apresentou diferença quando comparado à linhagem WM164 parental (Figura 38).

Também foi avaliada a expressão gênica de FRA-1, importante regulador da expressão de MMPs e transição epitélio-mesenquimal (Figura 39). A expressão gênica de FRA-1 foi exacerbada nos clones WM164 CI e na linhagem WM164R (Figura 39).

Figura 28. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a (A) curva de crescimento, (B) análise do ciclo celular por 72h, (C) proliferação celular por 96h. Em (D), encontram-se os dados plotados de (C). T₀: tempo de 0 horas, ou seja, referente ao dia do plaqueamento celular. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001, ANOVA Tukey-Kramer.

Visto que muitas células, na aquisição da malignidade, começam a expressar proteínas relacionadas à capacidade de pluripotência celular, avaliamos a expressão de proteínas relacionadas à característica tronco celular, pelo ensaio de *Stem cell-ness array* (Figura 29). O clone WM164 CII apresentou maior expressão de *Snail* (12%), marcador de EMT, enquanto CI apresentou maior expressão de OTX-2 (18,8%) (Figura 36). É importante salientar que GATA-4 foi inibido (27%) no clone resistente - WM164R (Figura 29), como principais resultados deste ensaio.

Visto que os processos de invasão e migração estão intimamente ligados, avaliamos também a capacidade de invasão e migração celulares pelo ensaio de transwell e ferida, respectivamente (Figuras 30A e 30 B, respectivamente). O clone WM164 CI apresentou maior capacidade de invasão em câmara de Boyden comparado às outras linhagens celulares. (Figura 30A). Para migração celular, os clones WM164 CI e CII apresentaram maior capacidade de migração (98% e 90%, respectivamente), visto maior fechamento da ferida, comparado as outras linhagens WM164 (Figura 30B). É interessante observar que o clone resistente WM164R não apresentou perfil migratório nas condições testadas (Figura 30B).

A proliferação de clones tumorais sem a dependência de ancoragem à matriz extracelular foi analisada pelo ensaio de crescimento celular em “cama” de agarose (Figura 31). Neste ensaio, ambas as subpopulações clonais WM164 CI e CII apresentaram rápido crescimento celular independentemente de ancoragem, assim como as linhagens parental e a resistente. No entanto, a subpopulação clonal WM164 CII apresentou visualmente esferoides menores e em maior quantidade quando comparados à linhagem parental WM164 (Figura 31). Todavia, a subpopulação clonal WM164 CI não apresentou diferença quando comparado à linhagem WM164 parental (Figura 31).

Também foi avaliada a expressão gênica de FRA-1, importante regulador da expressão de MMPs e transição epitélio-mesenquimal (Figura 32). A expressão gênica de FRA-1 foi exacerbada nos clones WM164 CI e na linhagem WM164R (Figura 32).

Figura 29. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a expressão proteica de marcadores de pluripotência GATA-4, OTX-2 e Snail por 72 horas. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$, ANOVA Tukey-Kramer.

Figura 30. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a (A) invasão celular e (H) migração celular. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$, ANOVA Tukey-Kramer.

Figura 31. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a crescimento celular independente de ancoragem. Aumento: 50x.

Figura 32. Heterogeneidade da linhagem tumoral de melanoma metastático WM164 e seus subclones quanto a expressão gênica de FRA1. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$, ANOVA Tukey-Kramer.

4.2. Sensibilidade das subpopulações de melanoma ao inibidor de BRAF vemurafenibe

Para avaliar se a heterogeneidade tumoral clonal poderia influenciar a resposta à terapia antimelanoma, as subpopulações isoladas a partir da linhagem parental foram analisadas na presença do antitumoral vemurafenibe, potente inibidor de B-Raf. Para os ensaios, foi utilizada a dose referente a inibição celular equivalente a 50% das células da linhagem parental (IC₅₀) que corresponde à 3 μM. As subpopulações também foram comparadas com a mesma linhagem tumoral porém com resistência induzida ao vemurafenibe, para investigar o quanto as subpopulações clonais poderiam se assemelhar à população quimiorresistente.

A indução de parada de ciclo celular em todas as linhagens foi avaliada após 48 horas de tratamento com vemurafenibe. A subpopulação clonal WM164 CI apresentou um considerável aumento no número de células (23%) na fase sub-G1/G0 (Figura 33A), que corresponde às células com DNA fragmentado. Além disso, as subpopulações clonais WM164 CI e CII apresentaram diferença entre elas quanto ao número de células na fase S do ciclo celular (8,6% e 5% para a dose de 3 μM de PLX) após o tratamento (Figura 33B). É possível notar que a subpopulação clonal WM164 CI apresentou maior ativação de fosfo-Rb (pRb) após o tratamento com vemurafenibe, indicando parada de ciclo celular, quando comparado à linhagem WM164 parental e a subpopulação clonal CI (Figura 33C).

As vias de ativação de sobrevivência celular foram avaliadas após tratamento com vemurafenibe. Na linhagem WM164, a via de MAPK difere quanto à ativação de ERK, apresentando maior fosforilação na subpopulação clonal WM164 CII (Figura 34A). Os reguladores positivos de ERK, como as expressões proteicas totais CRAF e EGFR, também seguiram o mesmo perfil de expressão de ERK (Figura 34B). No entanto, não houve alteração de expressão proteica de AKT fosforilado entre as populações parental e subclonais após o tratamento com vemurafenibe (Figura 34C). Além disso, avaliou-se a ativação de ERK com relação ao tempo de tratamento e à dose de vemurafenibe utilizada. A subpopulação clonal WM164 CI apresentou ativação de ERK mesmo em menor tempo de tratamento com o agente, enquanto a subpopulação clonal WM164 CII apresentou perfil semelhante à linhagem parental WM164, que só apresentou ativação dessa proteína em tempos maiores de tratamento (Figura 34D).

Todavia, não houve diferença significativa entre as culturas analisadas quando se comparou a dose-dependência da ativação de ERK (Figura 34E).

A sobrevivência celular com base na capacidade de uma única célula formar uma colônia foi avaliada após administração de doses subtóxicas e tóxicas de vemurafenibe. A subpopulação clonal WM164 CI apresentou maior número de colônias, mesmo em doses elevadas do quimioterápico (3 μ M), em comparação com a linhagem parental e com a subpopulação clonal CII (Figura 35). Além disso, a subpopulação clonal WM164 CII apresentou formação de colônias menores quando comparado com as outras culturas celulares (Figura 35).

Analisou-se também a senescência de células de melanoma após o tratamento com vemurafenibe por 72h (Figura 36). Somente o clone WM164 CI apresentou células senescentes após o tratamento com vemurafenibe, comparado a linhagem parental WM164 (Figura 36). É interessante ressaltar que a senescência de WM164R é causada pela ausência de vemurafenibe, visto que quanto maior a dose do composto, menor a presença de senescência (Figura 36).

A subpopulação clonal WM164 CI apresentou maior viabilidade celular (76%, para a dose de 1 μ M de PLX) após o tratamento com vemurafenibe por MTT (Figura 37A) e, no entanto, apresentou maior indução de apoptose (32,8%) quando comparado a subpopulação clonal WM164 CII (Figura 37A). Além disso, é importante salientar que a subpopulação clonal WM164 CII apresentou menor quantidade de células positivas para anexina V (17%) e maior expressão da proteína antiapoptótica Mcl-1, quando comparado à população parental e à WM164 CI respectivamente (Figuras 37B e 37C). Não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens quanto à expressão das outras proteínas relacionadas ao controle de apoptose, BAD e BIM (Figura 37C).

A viabilidade do tumor 3D (esferoide) também foi avaliada após o tratamento com vemurafenibe (PLX). A subpopulação clonal WM164 CI apresentou perfil semelhante à linhagem celular parental (Figura 38). No entanto, a subpopulação clonal WM164 CII apresentou visualmente menor sensibilidade ao fármaco (ou seja, menor incorporação de iodeto de propídio) quando comparado com as outras culturas de células WM164 (Figura 38).

A)

B)

C)

Figura 33. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a (A) parada em ciclo celular e (C) expressão proteica de proteínas reguladoras do ciclo celular: ativação de pRb, CDK4 e ciclina D1. Em (B), encontra-se as porcentagens de células em cada fase do ciclo celular, representado por (A). O tratamento foi realizado por 48 horas.

Figura 34. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a (A) ativação de ERK, (B) expressão proteica de proteínas reguladoras da via de BRAF: CRAF, ativação de GSK3 β e EGFR, (C) ativação de AKT e (D) sensibilidade tempo e (E) dose dependente a vemurafenibe. O tratamento foi realizado por 72 horas.

Figura 35. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a formação de colônias, pelo ensaio clonogênico. O tratamento foi realizado por 1 mês, duas vezes por semana.

Figura 36. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a indução de senescência celular. O tratamento foi realizado por 72 horas.

Figura 37. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a (A) viabilidade celular em monocamada, (B) indução de apoptose e (C) expressão de proteínas anti-apoptóticas: ativação de BAD, BIM e Mc-1. O tratamento foi realizado por 48 horas.

Figura 38. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a viabilidade celular em modelo tridimensional de esferoides tumorais. O tratamento foi realizado por 72 horas.

4.3. Influência da heterogeneidade tumoral sobre a capacidade de invasão de células de melanoma na presença de vemurafenibe

Sabe-se que tumores são constituídos por subpopulações que apresentam diferentes perfis invasivos. Visto que a quimiorresistência e a alta invasidade do melanoma podem estar associadas, decidimos investigar se a heterogeneidade poderia influenciar o processo de invasão tumoral, mesmo na presença de vemurafenibe e, para isso, avaliamos o potencial invasivo e tumorigênico das subpopulações clonais isoladas.

Inicialmente, analisamos a expressão de regulares da invasão celular. A expressão proteica de RECK, um clássico supressor da invasão tumoral, foi acentuada nos subclones tumorais após o tratamento com vemurafenibe (Figura 39A). Conforme observado na Figura 39A, o tratamento com vemurafenibe é capaz de estimular a expressão de RECK nas células parentais e na subpopulação clonal WM164 CII, as quais apresentaram expressão aumentada dessa proteína após o tratamento por 72 horas (Figura 39A). Também foram avaliadas a expressão gênica de REPIN-1, outro regulador da expressão de MMPs (Figura 39B). A expressão gênica de REPIN-1 foi induzida na presença de vemurafenibe, apresentando maior expressão na linhagem parental e em WM164 CII (Figura 39B). A expressão gênica de MMP-1 e MMP-2 também foi avaliada nas subpopulações clonais em comparação com a população parental WM164 (Figuras 39C e 39D). A subpopulação WM164 CI apresentou maior expressão gênica tanto para MMP-1 quanto para MMP-2 (Figuras 39C e 39D). Interessantemente, a população resistente ao vemurafenibe WM164R apresentou alta expressão gênica de MMP-1 após o tratamento com o composto (Figura 39C).

A EMT é considerada um fenômeno importante para a aquisição de invasividade e quimiorresistência tumorais. Algumas proteínas relacionadas a este fenômeno foram avaliadas após tratamento com vemurafenibe (Figura 40). Para a linhagem parental WM164 e os suas respectivas subpopulações clonais, não foi possível avaliar a expressão de E-caderina e não foram encontradas diferenças na expressão de Snail entre as linhagens (Figura 40). É possível observar que o subpopulação clonal WM164 CII apresentou maior expressão de N-caderina mesmo depois do tratamento com vemurafenibe, e menor expressão de STAT3, integrina α V e FAK em comparação às outras culturas celulares (Figura 40).

Para avaliar o potencial tumorigênico e sua influência nos processos de invasão celular, avaliamos as interleucinas pró tumorais IL-6 e IL-8 nos clones de WM164 após tratamento com vemurafenibe (Figuras 41A e 41B). Observa-se que, em monocamada, somente a população resistente WM164R foi capaz de induzir a secreção de IL-6 (41A). Para IL-8, sua expressão foi maior em WM164 CI e na população resistente ao vemurafenibe WM164R (Figura 41B).

A invasão em modelo tridimensional de pele humana reconstruída *in vitro* foi avaliada quanto ao potencial invasivo de WM164 e seus respectivos clones após tratamento com vemurafenibe (Figura 42A). Nesse ensaio, podemos observar que WM164 CI apresentou elevada capacidade de invasão através da membrana basal, e que o tratamento com vemurafenibe foi capaz de inibir de forma exacerbada toda a proliferação tumoral, assim como observado nas peles contendo WM164 parental. A subpopulação WM164 CII apresentou aparente diminuição no número de células tumorais após o tratamento, porém de forma menos evidente se comparada às células WM164 parentais e ao subclone WM164 CI. Este fenômeno não foi observado nas peles contendo as células quimioresistentes WM164R, conforme esperado, já que estas células tumorais são resistentes e dependentes do fármaco, o que pôde ser observado pelo aparente estímulo na geração de tumores frente ao tratamento (Figura 42A). Quando avaliamos a expressão de interleucinas pró tumorais no modelo de pele reconstruída contendo células tumorais parentais, subclonais e resistentes, podemos observar que o microambiente tumoral foi capaz de exacerbar a expressão das citocinas das células parentais, CI e CII, principalmente para IL-6 (Figura 42B), quando comparada à nula expressão em monocamada (Figura 42C).

Figura 39. Capacidade de invasão tumoral das subpopulações de melanoma WM164 quanto a (A) expressão proteica de RECK, (B) expressão gênica de REPIN1, reguladores de MMPs, e da expressão gênica de (C) MMP-1 e (D) MMP-2. O tratamento foi realizado por 72 horas.

A)

B)

C)

D)

Figura 40. Capacidade de invasão tumoral das subpopulações de melanoma WM164 quanto a expressão proteica de reguladores de EMT e adesão celular: N-caderina, integrina α V, Snail, FAK E STAT3. O tratamento foi realizado por 72 horas.

Figura 41. Capacidade de invasão tumoral das subpopulações de melanoma WM164 quanto a secreção de citocinas pró-tumorais (A) IL-6 e (B) IL-8 de subpopulações em monocamada. O tratamento foi realizado por 72 horas.

Figura 42. Capacidade de invasão tumoral das subpopulações de melanoma WM164 em (A) modelo de pele humana reconstruída *in vitro*. As setas indicam os focos de invasão tumoral. Também avaliou-se a secreção de (B) IL-6 e (C) IL-8 das subpopulações tumorais inseridas nesse ambiente tridimensional (A). O tratamento foi realizado por cinco dias.

5. DISCUSSÃO

5.1. *Heterogeneidade intrínseca do melanoma*

Com raras exceções, os tumores espontâneos são originados a partir de uma única célula tumoral que prolifera, formando a massa tumoral. No entanto, muitos estudos apresentam fortes evidências de que as massas tumorais são uma combinação de subpopulações clonais heterogêneas, ao invés de uma massa clonal homogênea, como se acreditou por muitos anos (Visvader 2011). Portanto, o conhecimento sobre a presença de heterogeneidade tumoral intrínseca (pré-terapia anti-tumoral) ou adaptativa (pós-terapia) ainda é deficiente e necessita estudos de caracterização, a fim de aprimorar as abordagens terapêuticas (Marusyk et al. 2012; Widmer et al. 2014).

Inicialmente, decidimos avaliar o potencial de heterogeneidade tumoral intrínseca da população inicial da linhagem de melanoma metastático WM164, denominada, então, de população parental. Avaliamos sua composição celular por diversos parâmetros para identificar se as células filhas eram ou não similares fenotipicamente entre si. Isolamos, a partir de um evento estocástico, as células a partir da população parental, sem nenhuma indução de mutação ou dano ao DNA e nem nenhum tipo de alteração do meio, como alteração de pH, oxigênio, presença de matriz ou células do estroma, ação de fármacos, justamente para avaliar se a heterogeneidade já se encontrava de forma intrínseca na linhagem tumoral parental. Neste caso, isolamos apenas os subclones que seriam capazes de se proliferar na ausência de outras subpopulações clonais diferentes, ou seja, subclones que não apresentam co-dependência subclonal. Cada célula que sobreviveu isoladamente ao acaso e que foi capaz de proliferar gerando uma colônia independente, foi denominada como uma nova subpopulação clonal. Cada subpopulação foi isolada a partir de uma única célula (clone), a partir da linhagem parental, conforme descrito na seção Materiais e Métodos do Capítulo II desta tese.

É importante ressaltar que nem todos os clones progrediram após o isolamento estocástico. Isso se deve ao fato que muitos clones tumorais co-dependem da existência de outros clones para proliferação e sobrevivência. O trabalho de Nowell (1976) já havia relatado sobre a presença de clones tumorais esporádicos, que aparecem ao longo da evolução tumoral somente se há a pré-existência de outros clones específicos,

estabelecendo uma co-dependência. Por este motivo, a presença desses clones na população parental inicial é muito difícil de ser detectada.

A análise de STR indicou que os subclones apresentaram o mesmo perfil de *loci* gênicos comparados a linhagem parental, comprovando, portanto, que todas eram oriundas da população parental inicial.

Através de nossos ensaios de proliferação celular, migração, expressão de marcadores de pluripotência e de proteínas associadas à transição epitélio-mesenquimal, podemos afirmar que a população parental do melanoma metastático humano WM164 é heterogênea já que suas subpopulações clonais isoladas estocasticamente, ou seja, ao acaso, são diferentes entre si em vários dos parâmetros avaliados. O mesmo ocorreu com a linhagem parental A375, cujos resultados estão apresentados no Anexo II, os quais reforçam a ideia de que a heterogeneidade tumoral não é linhagem específica em nosso modelo. De fato, dados da literatura mostram que as subpopulações de um tumor podem diferir quanto à morfologia, expressão gênica, metabolismo, motilidade celular, proliferação e potencial metastático (Anaka et al., 2013). Isso não ocorre necessariamente devido a presença ou aquisição de mutações novas. A presença de ruídos de transcrição (*gene expression noise*) pode ser uma das causas dessa diferença fenotípica observada entre as subpopulações clonais (Capp 2010). Sabe-se que mesmo populações isogênicas podem apresentar diferentes expressões de transcrição gênica entre si, que acarretarão em mudanças fenotípicas entre seus indivíduos.

Nossos resultados mostraram diferentes perfis de ciclo celular para os subpopulações analisadas. O subclone WM164 CI maior proliferação (maior fase G2/M), quando comparado as outras linhagens celulares analisadas. Células que apresentam ciclos celulares diferentes e não sincronizados podem apresentar expressão gênica distinta devido ao envelhecimento celular (Roesch et al. 2010; Capp 2010; Zhang et al. 2013). O “*gene expression noise*” é o fator que controla a expressão gênica de células tronco e já foi provado que pode ser a causa da falha de muitas terapias empregadas no tratamento tumoral (Brock et al. 2009; Zhang et al. 2013).

Nossos resultados, em conjunto, demonstraram que as linhagens celulares parentais utilizadas apresentam algumas subpopulações intrinsecamente mais proliferativas e mesenquimal-like, ao passo que os subclones isolados apresentaram diferenças entre si quanto à proliferação celular, formação de tumores (esferoides) e expressão de fatores associados a aquisição de malignidade. A subpopulação clonal

WM164 CI apresentou maior perfil proliferativo, apresentando maior curva de crescimento, e proliferação celular e também maior perfil migratório e invasivo. O subclone WM164 CI apresentou alta expressão proteica do oncogene OTX-2, importante marcador de pluripotência. Já foi mostrado que a superexpressão de OTX-2 leva ao aumento da proliferação celular e migração tumoral (Adamson et al. 2011; Wortham et al. 2012).

Por outro lado, o subclone WM164 CII apresentou menor proliferação e maior perfil mesenquimal, através da expressão das proteínas de desdiferença celular GATA-4 e Snail, e ainda maior número de colônias que sobreviveram a ausência de matriz extracelular. O gene GATA-4 está associado à inibição de senescência celular, por sua interação com a alta expressão de ERK (Liang et al. 2001; Ma et al. 2014). Já Snail está intimamente ligado à transição epitelial-mesenquimal pelas células tumorais e a resistência de morte celular por *anoikis*, através da repressão de E-caderina .

Além disso, WM164 CII também apresentou maior expressão gênica de FRA-1 (FOSL-1), que, dentre outras funções, é um regulador positivo do crescimento celular independente de ancoragem. FRA-1 é um membro da família de fatores de transcrição FOS, altamente expresso em tumores. Ele desempenha um papel importante na transformação, invasão e metástase de células neoplásicas. As células tumorais que apresentam menor expressão de FRA-1 se proliferam com mais rapidez; entretanto sua alta expressão é induzida por vemurafenibe em células de melanoma como efeito adverso e pode estar relacionada com a aquisição de quimiorresistência, através da regulação de proteínas que participam do processo de EMT e da indução do processo de dormência tumoral (Tiwari et al. 2003; Belguise et al. 2005; Takagi et al. 2009; Lu et al. 2012; Henckels & Prywes 2013; Diesch et al. 2014; Obenauf et al. 2015).

5.2. A sensibilidade a vemurafenibe reflete a heterogeneidade tumoral do melanoma

A heterogeneidade tumoral clonal pode contribuir para o fenômeno de quimiorresistência, além de dificultar a busca por biomarcadores tumorais eficientes (Meacham & Morrison, 2013) no diagnóstico tumoral. Conceitualmente, a quimiorresistência pode ser subclassificada em resistência tumoral intrínseca ou resistência tumoral adquirida. A resistência intrínseca refere-se à capacidade que

algumas células tumorais parentais possuem para escapar de mecanismos de ação de fármacos antitumorais, como indução de morte celular e parada de ciclo, e inibição da invasão e sobrevivência celular. Pacientes que apresentam tumores com resistência tumoral intrínseca frequentemente não são responsivos aos quimioterápicos padrão. Por outro lado, tumores com resistência adquirida respondem inicialmente ao tratamento, mas posteriormente desenvolvem mecanismos adaptativos que permitem sua sobrevivência mesmo na presença de determinado fármaco antitumoral. Os pacientes com tais tumores muitas vezes demonstram uma resposta inicial favorável, mas, subsequentemente, apresentam recidiva, tornando-se refratários à quimioterapia. Embora os efeitos antitumorais de inibidores de BRAF, como o vemurafenibe, sejam muito apreciados no tratamento do melanoma, as resistências intrínseca e adquirida limitam o benefício terapêutico desses fármacos (Meacham & Morrison, 2010; Ossowski & Aguirre-Ghiso, 2010; Magee et al., 2012; Lito et al., 2013).

Nossos resultados, em conjunto, mostraram que as linhagens celulares parentais utilizadas apresentam subpopulações intrinsicamente resistentes ao vemurafenibe, ao passo que os subclones isolados analisados apresentaram diferenças entre si quanto à viabilidade celular, indução de apoptose e fosforilação de ERK após o tratamento com vemurafenibe. O subclone WM164 CI apresentou a menor suscetibilidade à citotoxicidade do vemurafenibe, o que não se mostrou diretamente associado à indução de apoptose por esse fármaco. Apesar de o processo de apoptose estar intimamente relacionado à atividade mitocondrial avaliada pelo ensaio do MTT, os dois fatores nem sempre podem ser fielmente correlacionados (Green & Reed, 1998). Há estudos que mostram que a redução de MTT pode também ocorrer fora da mitocôndria em alguns sistemas celulares e que a ativação de caspases pode induzir a um maior dano mitocondrial com consequente perda da capacidade de redução de MTT, tal como um circuito de retroalimentação para conter o dano (Kho & Cotman, 1992; Verde & Reed, 1998; Kidd, 1998).

Além disso, os nossos resultados mostraram que os subclones isolados apresentaram menores taxas de apoptose induzida por vemurafenibe do que as culturas de células parentais. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram que, provavelmente, a população celular parental é composta majoritariamente de células sensíveis ao tratamento, o que mascara as células resistentes, presentes em menor quantidade na população parental (Merlo et al., 2006; Lito et al., 2013).

Os subclones de WM164 apresentaram características muito distintas, que contribuem para a vantagem tumoral frente à seleção em diversos microambientes (Greaves & Maley, 2012). O subclone WM164 CI não respondeu à inibição de ERK por vemurafenibe e foi capaz de formar colônias mesmo em baixa confluência e na presença de doses tóxicas do referido composto. Por outro lado, WM164 CII apresentou perfil ainda mais resistente, ou seja, apresentou crescimento independente da confluência inicial e da ancoragem à matriz extracelular, o que pode ser justificado por suas características de células mesenquimais, como a elevada expressão de N-caderina. Além disso, esse subclone apresentou maiores níveis de autofagia após o tratamento e menor sensibilidade ao quimioterápico.

5.3. A resistência a vemurafenibe está atrelada a maior EMT nas subpopulações clonais

Foi investigado se a resistência intrínseca ao vemurafenibe poderia interferir no processo invasivo com consequente alteração na expressão de RECK após o tratamento com vemurafenibe. Pôde-se observar que, nas duas linhagens de melanoma analisadas, a forma ativa de RECK é superexpressa somente após o tratamento com o fármaco. Com isso, é possível sugerir que a expressão de RECK esteja ligada à resposta de inibição da proliferação e invasão celular por vemurafenibe. De fato, dados da literatura relatam que RECK pode inibir a proliferação celular em algumas células tumorais (Takahashi et al., 1998; Hirata et al., 2013). Adicionalmente, é possível que a investigação da importância de MMPs nessas linhagens tumorais contribua para a elucidação dos mecanismos de malignidade, visto que essas enzimas são tipicamente inibidas por RECK.

O clone WM164 CI apresentou maior proliferação e maior invasão em monocamada e em modelo 3D de pele humana reconstruída. Porém apresentou menor morte celular frente ao tratamento e menor expressão de RECK. Já o clone WM164 CII apresentou menor proliferação e maior expressão de proteínas relacionadas a EMT e pluripotência, continuamente com a expressão de RECK após o tratamento. Já foi relatado que RECK pode modular a expressão de Notch 1 e FRA-1, que levam à EMT (Hong et al. 2014).

RECK é conhecidamente regulador de FRA-1 e c-Jun, importantes reguladores da EMT (Takagi et al. 2009). Recentes estudos tem alegado que a diminuição de c-Jun é, por sua vez, responsável pela aquisição de resistência a inibidores de B-RAF através da modulação de EMT (Ramsdale et al. 2015).

Nossos resultados, em conjunto, mostraram que as linhagens celulares parentais utilizadas apresentam algumas subpopulações intrinsicamente resistentes ao vemurafenibe, que são inversamente invasivas, cujo modelo segue a seguir.

Figura 43. Modelo de heterogeneidade tumoral apresentado no Capítulo II.

6. CONCLUSÃO

O estudo do comportamento das subpopulações clonais heterogêneas é essencial para elucidar os fenômenos de resistência intrínseca ou adquirida dos tumores aos quimioterápicos, como por exemplo, o vemurafenibe. Em nosso modelo experimental, caracterizamos a presença de duas subpopulações clonais distintas na linhagem de melanoma metastático humano, WM164: a subpopulação WM164 CI, mais proliferativa, mais invasiva e sensível a inidores de B-RAF; e WM164 CII, menos proliferativa e que apresenta maior expressão de RECK e fatores ligados a EMT.

Segundo o nosso modelo, a resistência intrínseca ao vemurafenibe está presente e reflete a heterogeneidade presente no tumor inicial.

Isso indica que, caso a terapia empregada no paciente não seja adequada, as subpopulações menos sensíveis ao tratamento poderão se tornar refringentes ao tratamento.

Com nosso trabalho, pretendemos enriquecer o conhecimento sobre a composição clonal presente na heterogeneidade tumoral, contribuindo para melhores abordagens para a terapia do melanoma.

BIBLIOGRAFIA

- Adamson, D.C. et al., 2011. OTX2 is critical for maintenance progression of Shh-independent MB. , 70(1), p.181–191.
- Alexius-lindgren, M. et al., 2014. The RECK Gene and Biological Malignancy – Its Significance in Angiogenesis and Inhibition of Matrix Metalloproteinases. , 3874, p.3867–3873.
- Anaka, M. et al., 2013. Intratumoral genetic heterogeneity in metastatic melanoma is accompanied by variation in malignant behaviors. *BMC medical genomics*, 6(1), p.40. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3852494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Anderson, A.R. et al., 2006. Tumor Morphology and Phenotypic Evolution Driven by Selective Pressure from the Microenvironment. *Cell*, 127(5), p.905–915.
- Becker, T.M. et al., 2014. Mutant B-RAF-Mcl-1 survival signaling depends on the STAT3 transcription factor. *Oncogene*, 33(9), p.1158–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23455323>.
- Belguise, K. et al., 2005. FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene*, 24(8), p.1434–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608675> [Acessado janeiro 13, 2016].
- Bennetzen, M. V et al., 2013. Acetylation dynamics of human nuclear proteins during the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(11), p.1688–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3713127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Berg, K.D. et al., 2008. Caveolae in fibroblast-like synoviocytes: static structures associated with vimentin-based intermediate filaments. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(1), p.103–114. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18648844> [Acessado outubro 6, 2015].
- Berger, M.F. et al., 2010. Integrative analysis of the melanoma transcriptome. *Genome Research*, 20(4), p.413–427.
- Bollag, G. et al., 2010. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, 467(7315), p.596–599. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature09454>.
- Bollag, G. et al., 2012. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, (October). Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3847>.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, p.248–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> [Acessado julho 9, 2014].

- Breslow, a, 1970. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery*, 172(5), p.902–908.
- Brock, A., Chang, H. & Huang, S., 2009. Non-genetic heterogeneity--a mutation-independent driving force for the somatic evolution of tumours. *Nature reviews. Genetics*, 10(5), p.336–342.
- Brohem, C.A. et al., 2012. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. *Pigment cell & melanoma research*, 25(3), p.354–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22372875> [Acessado outubro 8, 2015].
- Capp, J.P., 2010. Noise-driven heterogeneity in the rate of genetic-variant generation as a basis for evolvability. *Genetics*, 185(2), p.395–404.
- Carlino, M.S. et al., 2013. Antiproliferative effects of continued mitogen-activated protein kinase pathway inhibition following acquired resistance to BRAF and/or MEK inhibition in melanoma. *Molecular cancer therapeutics*, 12(7), p.1332–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23645591>.
- Chang, C.-W. et al., 2014a. Epigallocatechingallate Inhibits Migration of Human Uveal Melanoma Cells via Downregulation of Matrix Metalloproteinase-2 Activity and ERK1/2 Pathway. *BioMed Research International*, 2014, p.1–9. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/141582/>.
- Chang, C.-W. et al., 2014b. Epigallocatechingallate inhibits migration of human uveal melanoma cells via downregulation of matrix metalloproteinase-2 activity and ERK1/2 pathway. *BioMed research international*, 2014, p.141582. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4145379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acessado janeiro 13, 2016].
- Chang, H.C., Cho, C.Y. & Hung, W.C., 2006. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. *Cancer Research*, 66(17), p.8413–8420.
- Chang, H.-C., Cho, C.-Y. & Hung, W.-C., 2007. Downregulation of RECK by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Cancer science*, 98(2), p.169–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17233834> [Acessado outubro 6, 2015].
- Chang, J. et al., 2011. Differential response of cancer cells to HDAC inhibitors trichostatin A and depsipeptide. *British Journal of Cancer*, 106(1), p.116–125. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3251870&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acessado outubro 5, 2015].
- Chapman, A. et al., 2013. Heterogeneous Tumor Subpopulations Cooperate to Drive Invasion. *Cell Reports*, 8(3), p.688–695. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.045>.
- Clark, J.C.M. et al., 2007. RECK - A newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(3-4), p.675–683.
- Corrêa, T.C.S. et al., 2010. RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. *Journal of Cellular Biochemistry*, 110(1), p.52–61.

- Dankort, D. et al., 2009. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nature genetics*, 41(5), p.544–552.
- Demchenko, A.P., 2012. The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. *Experimental oncology*, 34(3), p.263–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070011> [Acessado outubro 29, 2015].
- Diesch, J. et al., 2014. Widespread FRA1-Dependent Control of Mesenchymal Transdifferentiation Programs in Colorectal Cancer Cells. *PLoS ONE*, 9(3), p.1–11.
- Ding, L. et al., 2013. Advances for studying clonal evolution in cancer. *Cancer Letters*, 340(2), p.212–219. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.12.028>.
- Discacciati, M.G. et al., 2015. MMP-9/RECK Imbalance: A Mechanism Associated with High-Grade Cervical Lesions and Genital Infection by Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24(10), p.1539–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26261088> [Acessado outubro 6, 2015].
- Dobbin, Z.C. et al., 2014. Using heterogeneity of the patient-derived xenograft model to identify the chemoresistant population in ovarian cancer.
- Feigelson, H.S. et al., 2014. Approaches to integrating germline and tumor genomic data in cancer research. *Carcinogenesis*, 35(10), p.2157–2163. Available at: <http://www.carcin.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/bgu165>.
- Franken, N.A.P. et al., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), p.2315–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473> [Acessado julho 15, 2014].
- Freshney, R.I., 1987. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, Available at: https://books.google.com.br/books/about/Culture_of_Animal_Cells.html?id=1ViKqBaFl8UC&pgis=1 [Acessado outubro 8, 2015].
- Fukunaga-Kalabis, M., Roesch, A. & Herlyn, M., 2011. From Cancer Stem Cells to Tumor Maintenance in Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(8), p.1600–1604. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/jid.2011.159>.
- Fukushima, T. & Takenoshita, S., 2005. Roles of RAS and BRAF mutations in thyroid carcinogenesis. *Fukushima journal of medical science*, 51(2), p.67–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16555627> [Acessado outubro 28, 2015].
- Furumoto, K. et al., 2001. RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. *Hepatology*, 33(1), p.189–195.
- Gallagher, P.G. et al., 2005. Gene expression profiling reveals cross-talk between melanoma and fibroblasts: Implications for host-tumor interactions in metastasis. *Cancer Research*, 65(10), p.4134–4146.
- Garraway, L. a et al., 2005. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, 436(7047), p.117–

- Gerlinger, M. et al., 2014. Cancer: Evolution within a Lifetime. *Annual Review of Genetics*, 48(1), p.215–238. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-genet-120213-092314>.
- Gerlinger, M. & Swanton, C., 2010. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *British journal of cancer*, 103(8), p.1139–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2967073&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- GLOBOCAN, Fact Sheets by Cancer. Available at: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx [Acessado setembro 17, 2015].
- Goding, C.R., 2013. Fishful thinking: The rise and fall of MITF in melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, p.7–8.
- Goydos, J.S. et al., 2005. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. *Journal of the American College of Surgeons*, 200(3), p.362–370. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1072751504014048>.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. & Marais, R., 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445(7130), p.851–857.
- Greaves, M. & Maley, C.C., 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), p.306–313.
- Haass, N.K. & Herlyn, M., 2005. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*, 10(2), p.153–163.
- Hainaut, P. & Hollstein, M., 2000. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Advances in cancer research*, 77, p.81–137. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10549356> [Acessado outubro 26, 2015].
- Han, L. et al., 2012. MicroRNA-21 Expression is regulated by β -catenin/STAT3 Pathway and Promotes Glioma Cell Invasion by Direct Targeting RECK. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 18(7), p.573–583.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. a., 2011. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), p.646–674. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Henckels, E. & Prywes, R., 2013. Fra-1 regulation of Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) in metastatic variants of MDA-MB-231 breast cancer cells. *F1000Research*, 1, p.1–24.
- Hoek, K.S. et al., 2008. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Research*, 68(3), p.650–656.
- Hoek, K.S. & Goding, C.R., 2010. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 23(6), p.746–759.
- Hong, K.-J. et al., 2014. RECK Inhibits Stemness Gene Expression and Tumorigenicity of Gastric Cancer Cells by Suppressing ADAM-Mediated Notch1 Activation.

- Journal of Cellular Physiology*, 229(2), p.191–201. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.24434>.
- Horvat, T.Z. et al., 2015. Immune-Related Adverse Events, Need for Systemic Immunosuppression, and Effects on Survival and Time to Treatment Failure in Patients With Melanoma Treated With Ipilimumab at Memorial Sloan Kettering Cancer Center. *Journal of Clinical Oncology*, 33(28), p.3193–3198. Available at: <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2015.60.8448>.
- Hsu, M.C., Chang, H.C. & Hung, W.C., 2006. HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), p.4718–4725.
- INCA, INCA - Estimativa 2014. Available at: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR> [Acessado setembro 17, 2015].
- Jacomasso, T., Trombetta-Lima, M., Sogayar, M.C., et al., 2014. Downregulation of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in malignant melanoma. *Melanoma Research*, 24(1), p.32–39. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00008390-201402000-00004>.
- Jacomasso, T., Trombetta-Lima, M., Sogayar, M.C., et al., 2014. Downregulation of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in malignant melanoma: inverse correlation with membrane-type 1-matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase 2. *Melanoma research*, 24(1), p.32–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24335752>.
- Kaneko, T. et al., 2007. Bcl-2 Orchestrates a Cross-talk between Endothelial and Tumor Cells that Promotes Tumor Growth. *Cancer Research*, 67(20), p.9685–9693. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-1497>.
- Kemper, K. et al., 2015. Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts. , p.1–15.
- Khodadoust, M.S. et al., 2009. Melanoma Proliferation and Chemoresistance Controlled by the DEK Oncogene. *Cancer Research*, 69(16), p.6405–6413. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-09-1063>.
- Kim, J.E. et al., 2013. Heterogeneity of expression of epithelial-mesenchymal transition markers in melanocytes and melanoma cell lines. *Frontiers in Genetics*, 4(MAY).
- Kirkwood, J.M., 2012. Vemurafenib's companion assay refines use of the targeted therapy. *Community Oncology*, 9(3), p.83–84. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmonc.2012.02.010>.
- Kitajima, S. et al., 2011. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs interferes with epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene*, 30(6), p.737–750. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2010.448>.
- Ko, J.M. & Fisher, D.E., 2011. A new era: Melanoma genetics and therapeutics. *Journal of Pathology*, 223(2), p.241–250.
- Kong, Q. et al., 2011. Effect of trichostatin A and 5-Aza-2'-deoxycytidine on

- transgene reactivation and epigenetic modification in transgenic pig fibroblast cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 355(1-2), p.157–165.
- Lai, F. et al., 2013. Cotargeting histone deacetylases and oncogenic BRAF synergistically kills human melanoma cells by necrosis independently of RIPK1 and RIPK3. *Cell Death and Disease*, 4(6), p.e655. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cddis.2013.192>.
- Lee, K.J., Lee, K.Y. & Lee, Y.M., 2010. Downregulation of a tumor suppressor RECK by hypoxia through recruitment of HDAC1 and HIF-1 α to reverse HRE site in the promoter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(5), p.608–616. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488910000054>.
- Leite, K.R.M. et al., 2015. Controlling RECK miR21 Promotes Tumor Cell Invasion and Is Related to Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *Journal of Cancer*, 6(3), p.292–301. Available at: <http://www.jcancer.org/v06p0292.htm>.
- Lejeune, F.J., 2015. The conquest of melanoma by immunotherapy. , p.1–3.
- Li, F.Z. et al., 2015. Phenotype Switching in Melanoma: Implications for Progression and Therapy. *Frontiers in Oncology*, 5(February), p.1–7. Available at: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00031/abstract>.
- Liang, Q. et al., 2001. The Transcription Factor GATA4 Is Activated by Extracellular Signal-Regulated Kinase 1- and 2-Mediated Phosphorylation of Serine 105 in Cardiomyocytes The Transcription Factor GATA4 Is Activated by Extracellular Signal-Regulated Kinase 1- and 2-Mediated P. *Molecular and cellular biology*, 21(21), p.7460–7469.
- Lin, H.-Y., Chiang, C.-H. & Hung, W.-C., 2013. STAT3 upregulates miR-92a to inhibit RECK expression and to promote invasiveness of lung cancer cells. *British journal of cancer*, 109(3), p.731–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23820254>.
- Lito, P., Rosen, N. & Solit, D.B., 2013. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature medicine*, 19(11), p.1401–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202393>.
- Liu, D.P., Song, H. & Xu, Y., 2010. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene*, 29(7), p.949–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2837937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acessado outubro 28, 2015].
- Liu, S. et al., 2008a. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. *Pigment cell & melanoma research*, 21(5), p.545–558.
- Liu, S. et al., 2008b. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. *Pigment cell & melanoma research*, 21(5), p.545–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18627528> [Acessado novembro 25, 2015].
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), p.402–408. Available at: WOS:000173949500003.

- Lopez, J. et al., 2009. The context and potential of epigenetics in oncology. *British Journal of Cancer*, 100(4), p.571–577. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.bjc.6604930>.
- Lu, D. et al., 2012. Fra-1 promotes breast cancer chemosensitivity by driving cancer stem cells from dormancy. *Cancer research*, 72(14), p.3451–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22586064> [Acessado janeiro 26, 2016].
- Ma, C.-X. et al., 2014. EGF is required for cardiac differentiation of P19CL6 cells through interaction with GATA-4 in a time- and dose-dependent manner. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, p.2005–2022. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=25504289&retmode=ref&cmd=prlinks\papers3://publication/doi/10.1007/s00018-014-1795-9>.
- Magee, J. a., Piskounova, E. & Morrison, S.J., 2012. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell*, 21(3), p.283–296. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.003>.
- Marusyk, A., Almendro, V. & Polyak, K., 2012. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nature Reviews Cancer*, 12(5), p.323–334. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3261>.
- Marusyk, A. & Polyak, K., 2011. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta*, 1805(1), p.1–28.
- McCoy, K.D. & Le Gros, G., 1999. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and cell biology*, 77(1), p.1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1711.1999.00795.x> [Acessado agosto 23, 2015].
- Meacham, C.E. & Morrison, S.J., 2013. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*, 501(7467), p.328–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24048065>.
- Melnikova, V.O. & Bar-Eli, M., 2009. Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(3), p.257–267. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-148X.2009.00570.x>.
- Meng, C.F., Dai, D.Q. & Guo, K.J., 2008. Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on DNA methylation and expression of hMLH1 in ovarian cancer cell line COC1/DDP. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*, 27(12), p.1251–1255.
- Meng, N. et al., 2008. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. *Histology and Histopathology*, 23(8), p.1003–1010.
- Merlo, L.M.F. et al., 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews. Cancer*, 6(12), p.924–935.
- Meyle, K.D. & Guldberg, P., 2009. Genetic risk factors for melanoma. *Human Genetics*, 126(4), p.499–510.
- Mori, Y. et al., 2011. Novel candidate colorectal cancer biomarkers identified by methylation microarray-based scanning. *Endocrine-Related Cancer*, 18(4), p.465–478.
- Müller, J. et al., 2014. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple

- targeted drugs in melanoma. *Nature Communications*, 5, p.5712. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25502142>.
- Nagini, S., 2012. RECKing MMP: relevance of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs as a prognostic marker and therapeutic target for cancer (a review). *Anticancer Agents Med Chem*, 12(7), p.718–725. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292753>.
- Nazarian, R. et al., 2010. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*, 468(7326), p.973–977. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature09626>.
- Niezgoda, A., Niezgoda, P. & Czajkowski, R., 2015. Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy. *BioMed Research International*, 2015, p.1–16. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/851387/>.
- Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J., 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2), p.193–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1660837> [Acessado setembro 20, 2015].
- Noda, M. et al., 2003. RECK: A novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. *Cancer and Metastasis Reviews*, 22(i), p.167–175.
- Noda, M. & Takahashi, C., 2007. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. *Cancer Science*, 98(11), p.1659–1665.
- Nowell, P., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), p.23–28.
- Obenauf, A.C. et al., 2015. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature*. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature14336>.
- Oh, J. et al., 2001. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*, 107(6), p.789–800.
- Oh, J., Seo, B.W., et al., 2004. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer Research*, 64(24), p.9062–9069.
- Oh, J., Seo, D.-W., et al., 2004. Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. *Cancer research*, 64(24), p.9062–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604273> [Acessado janeiro 13, 2016].
- Oh, S.M., Oh, K. & Lee, D.-S., 2011. Intratumoral administration of secondary lymphoid chemokine and unmethylated cytosine-phosphorothioate-guanine oligodeoxynucleotide synergistically inhibits tumor growth in vivo. *Journal of Korean medical science*, 26(10), p.1270–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3192336&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ossowski, L. & Aguirre-Ghiso, J. a., 2010. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 23(1), p.41–56.

- Paraiso, K.H.T. et al., 2010. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *British journal of cancer*, 102(12), p.1724–1730. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605714>.
- Pennacchi, P.C. et al., 2015. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. *Tissue engineering. Part A*, 21(17-18), p.2417–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26132636> [Acessado setembro 2, 2015].
- Philips, G.K. & Atkins, M., 2015. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *International Immunology*, 27(1), p.39–46. Available at: <http://www.intimm.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/intimm/dxu095>.
- Polo, S.E. & Almouzni, G., 2005. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Letters*, 220(1), p.1–9. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383504006676>.
- Poynter, J.N. et al., 2006. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma research*, 16(4), p.267–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16845322>.
- Pramio, D.T., 2015. Perfil Mutacional De Melanomas Cutâneos E Impacto No Padrão Global De Metilação De Dna.
- Pryzbylowski, P., Obajimi, O. & Keen, J.C., 2008. Trichostatin A and 5 Aza-2' deoxycytidine decrease estrogen receptor mRNA stability in ER positive MCF7 cells through modulation of HuR. *Breast Cancer Research and Treatment*, 111(1), p.15–25.
- Rajaii, F. et al., 2014. The Demethylating Agent 5-Aza Reduces the Growth, Invasiveness, and Clonogenicity of Uveal and Cutaneous Melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(10), p.6178–6186. Available at: <http://www.iovs.org/cgi/doi/10.1167/iovs.14-13933>.
- Ramsdale, R. et al., 2015. The transcription cofactor c-JUN mediates phenotype switching and BRAF inhibitor resistance in melanoma. , 8(390), p.1–14.
- Read, J., Wadt, K. a W. & Hayward, N.K., 2015. Melanoma genetics. *Journal of Medical Genetics*, p.jmedgenet–2015–103150. Available at: <http://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2015-103150>.
- Rebecca, V.W. & Smalley, K.S., 2011. Tumor heterogeneity and strategies to overcome kinase inhibitor resistance in cancer: lessons from melanoma. *Expert opinion on investigational drugs*, 20(2), p.137–140.
- Rebecca, V.W., Sondak, V.K. & Smalley, K.S.M., 2012. A brief history of melanoma. *Melanoma Research*, 22(2), p.114–122.
- Rizos, H. et al., 2014. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: Spectrum and clinical impact. *Clinical Cancer Research*, 20(7), p.1965–1977.
- Roesch, a, 2015. Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. *Oncogene*, 34(23), p.2951–2957. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2014.249>.
- Roesch, A. et al., 2010. A Temporarily Distinct Subpopulation of Slow-Cycling Melanoma Cells Is Required for Continuous Tumor Growth. *Cell*, 141(4), p.583–

594. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741000437X>.
- Ropero, S. & Esteller, M., 2007a. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular oncology*, 1(1), p.19–25. Available at: <http://www.moloncol.org/article/S1574789107000026/fulltext> [Acessado dezembro 3, 2014].
- Ropero, S. & Esteller, M., 2007b. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular oncology*, 1(1), p.19–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19383284>.
- Rosell, R. et al., 2013. Adaptive resistance to targeted therapies in cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 2(3), p.152–159.
- Sasahara, R.M. et al., 2002. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. *Cancer detection and prevention*, 26(6), p.435–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12507228> [Acessado outubro 6, 2015].
- Schinke, C. et al., 2010. Aberrant DNA methylation in malignant melanoma. *Melanoma research*, 20(4), p.253–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3026062&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acessado outubro 7, 2015].
- Shaker, S. et al., 2003. Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leukemia research*, 27(5), p.437–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620295> [Acessado outubro 8, 2015].
- Shao, Y. & Aplin, a E., 2012. BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma. *Cell Death and Differentiation*, 19(12), p.2029–2039. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cdd.2012.94>.
- Shi, H. et al., 2014. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discovery*, 4(1).
- Shukla, S. & Meeran, S.M., 2014. Epigenetics of cancer stem cells: Pathways and therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(12), p.3494–3502. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416514003195>.
- Siegel, R. et al., 2014. Cancer Statistics , 2014. , 64(1), p.9–29.
- Simizu, S. et al., 2005. RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines. *Cancer Research*, 65(16), p.7455–7461.
- Smalley, K.S.M., 2013. Mutant BRAF: a novel mediator of microenvironmental escape in melanoma? *The Journal of investigative dermatology*, 133(5), p.1135–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594535>.
- Smalley, K.S.M. & Lioni, M., 2006. LIFE ISN ' T FLAT: TAKING CANCER BIOLOGY TO THE NEXT DIMENSION. , (October), p.242–247.
- Soengas, M.S., 1999. Apaf-1 and Caspase-9 in p53-Dependent Apoptosis and Tumor

- Inhibition. *Science*, 284(5411), p.156–159. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5411.156>.
- Soengas, M.S. et al., 2006. Apaf-1 expression in malignant melanoma. *Cell Death and Differentiation*, 13(2), p.352–353. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.cdd.4401755>.
- Soengas, M.S. et al., 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409(2000), p.207–211.
- Soengas, M.S. & Lowe, S.W., 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 22(20), p.3138–3151. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1206454>.
- Sosman, J. a. et al., 2012. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *New England Journal of Medicine*, 366(8), p.707–714.
- de Souza, C.F. et al., 2012. Mining gene expression signature for the detection of pre-malignant melanocytes and early melanomas with risk for metastasis. *PloS one*, 7(9), p.e44800. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3439384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acessado outubro 8, 2015].
- Spagnolo, F. et al., 2015. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. *OncoTargets and Therapy*, 8, p.157. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4303458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acessado outubro 5, 2015].
- Stepanenko, a. a., Vassetzky, Y.S. & Kavsan, V.M., 2013. Antagonistic functional duality of cancer genes. *Gene*, 529(2), p.199–207. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.047>.
- Sugihara, E. & Saya, H., 2013. Complexity of cancer stem cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 132(6), p.1249–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180591>.
- Sullivan, R.J., LoRusso, P.M. & Flaherty, K.T., 2013. The intersection of immune-directed and molecularly targeted therapy in advanced melanoma: Where we have been, are, and will be. *Clinical Cancer Research*, 19(19), p.5283–5291.
- Swaika, a, Hammond, W. a & Joseph, R.W., 2015. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol Immunol*, 67, p.4–17. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25749122>.
- Swanton, C., 2012. Intratumor heterogeneity: Evolution through space and time. *Cancer Research*, 72(19), p.4875–4882.
- Takagi, S., Simizu, S. & Osada, H., 2009. RECK Negatively Regulates Matrix Metalloproteinase-9 Transcription. *Cancer Research*, 69(4), p.1502–1508. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-2635>.
- Takagi, S., Simizu, S. & Osada, H., 2009. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. *Cancer research*, 69(4), p.1502–8. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/4/1502.long> [Acessado outubro 6,

2015].

- Takahashi, C. et al., 1998. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22), p.13221–13226.
- Das Thakur, M. et al., 2013. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature*, 494(7436), p.251–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3930354&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tiago, M. et al., 2014. Fibroblasts Protect Melanoma Cells from the Cytotoxic Effects of Doxorubicin. , 00(00), p.1–10.
- Tiwari, G. et al., 2003. Gene expression profiling in prostate cancer cells with Akt activation reveals Fra-1 as an Akt-inducible gene. *Molecular cancer research : MCR*, 1(April), p.475–484.
- Trainer, D.L. et al., 1985. Effect of 5-azacytidine on DNA methylation and the malignant properties of B16 melanoma cells. *Cancer Research*, 45(12), p.6124–6130.
- Tsao, H. et al., 2012. Melanoma: From mutations to medicine. *Genes and Development*, 26(11), p.1131–1155.
- UK, C.R., Melanoma skin cancer. Available at: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/type/melanoma/> [Acessado setembro 17, 2015].
- Valastyan, S. & Weinberg, R. a., 2011. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147(2), p.275–292. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>.
- Verhaegen, M. et al., 2006. A Novel BH3 Mimetic Reveals a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanism of Melanoma Cell Death Controlled by p53 and Reactive Oxygen Species. *Cancer Research*, 66(23), p.11348–11359. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-1748>.
- Vidanes, G.M., Bonilla, C.Y. & Toczyski, D.P., 2005a. Complicated tails: histone modifications and the DNA damage response. *Cell*, 121(7), p.973–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989948>.
- Vidanes, G.M., Bonilla, C.Y. & Toczyski, D.P., 2005b. Complicated tails: histone modifications and the DNA damage response. *Cell*, 121(7), p.973–6. Available at: <http://www.cell.com/article/S0092867405005969/fulltext> [Acessado outubro 5, 2015].
- Visigalli, D. et al., 2009. The carboxyl terminal trimer of procollagen I induces pro-metastatic changes and vascularization in breast cancer cells xenografts. *BMC cancer*, 9, p.59. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2652491&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Acessado janeiro 13, 2016].
- Visvader, J.E., 2011. Cells of origin in cancer. *Nature*, 469(7330), p.314–322.
- Walsh, L. a., Cepeda, M. a. & Damjanovski, S., 2012. Analysis of the MMP-dependent

- and independent functions of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 on the invasiveness of breast cancer cells. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 6(2), p.87–95.
- Wang, L. et al., 2015. Promoter hypermethylation of the cysteine protease RECK may cause metastasis of osteosarcoma. *Tumor Biology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26130413> [Acessado outubro 6, 2015].
- Wang, Y.A. et al., 2005. DNA methyltransferase-3a interacts with p53 and represses p53-mediated gene expression. *Cancer Biology and Therapy*, 4(October), p.1138–1143.
- Wei, Z. et al., 2013. STAT3 interacts with Skp2/p27/p21 pathway to regulate the motility and invasion of gastric cancer cells. *Cellular Signalling*, 25(4), p.931–938. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.01.011>.
- Wellbrock, C. & Arozarena, I., 2015. MITF in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell & Melanoma Research*, p.n/a–n/a. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/pcmr.12370>.
- Widmer, N. et al., 2014. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two - Targeted therapies. *European Journal of Cancer*, 50(12), p.2020–2036.
- Woods, D.M. et al., 2015. HDAC Inhibition Upregulates PD-1 Ligands in Melanoma and Augments Immunotherapy with PD-1 Blockade. *Cancer immunology research*. Available at: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/early/2015/09/08/2326-6066.CIR-15-0077-T.abstract> [Acessado setembro 2, 2015].
- Wortham, M. et al., 2012. Aberrant Otx2 expression enhances migration and induces ectopic proliferation of hindbrain neuronal progenitor cells. *PLoS ONE*, 7(4), p.2–9.
- Xue, P. et al., 2014. A novel compound RY10-4 induces apoptosis and inhibits invasion via inhibiting STAT3 through ERK-, p38-dependent pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Chemico-biological interactions*, 209, p.25–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24300195>.
- Zabierowski, S.E. & Herlyn, M., 2008. Melanoma stem cells: The dark seed of melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 26(17), p.2890–2894.
- Zanoni, T.B. et al., 2014. Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). *Toxicology letters*, 227(2), p.139–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657526> [Acessado outubro 29, 2015].
- Zhang, L. et al., 2015. Reduced Expression of RECK Protein May Help Differentiate Cutaneous Malignant Melanoma from Melanocytic Nevus. *Anticancer research*, 35(6), p.3185–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026078> [Acessado outubro 6, 2015].
- Zhang, X. et al., 2013. Investigating evolutionary perspective of carcinogenesis with single-cell transcriptome analysis. *Chinese Journal of Cancer*, 32(12), p.636–639.
- Zhou, X.Q. et al., 2014. Effects of 5-aza-2' deoxycytidine on RECK gene expression and tumor invasion in salivary adenoid cystic carcinoma. , 00, p.1–7.

Zhou, X.Q. et al., 2015. Effects of 5-aza-2'9 deoxycytidine on RECK gene expression and tumor invasion in salivary adenoid cystic carcinoma. , 48, p.254–260.

ANEXO I

A) Preparo das amostras para sequenciamento

A fim de confirmar a presença correta de *RECK* nos vetores selecionados, estes foram preparados e submetidos ao sequenciamento, realizado com o auxílio da Especialista de Laboratório Dra. Tatiana Corrêa (sob coordenação da Professora Marie Anne Van Sluya, Laboratório de Genômica e Elementos Transponíveis, IB – USP). Inicialmente, 2 µL de amostra foram adicionados ao mix contendo 2 µL de água MilliQ (Millipore) autoclavada, 2 µL de mix Forward e Reverse primers, 2 µL de Buffer (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA) e 2 µL de BigDye (Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, USA). Essa solução foi então incubada a 95°C por 90 segundos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 18 segundos, 55°C por 12 segundos e 60°C por 4 minutos. Realizou-se então uma reação de precipitação dos produtos e posterior adição de formamida, para a realização do sequenciamento. Para isto, adicionou-se 60 µL de isopropanol 65% em cada poço contendo os produtos da reação de sequenciamento. A placa foi agitada em vortex e incubada à temperatura ambiente por 25 minutos, ao abrigo da luz e, em seguida, centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi drenado sobre papel absorvente. Adicionou-se, então, 170 µL de etanol 60% e a placa foi novamente centrifugada 4000 rpm por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi drenado sobre papel absorvente e esperou-se secar por 20 minutos a 37°C. Por fim, os produtos foram ressuspensos em 10 µL de formamida e encaminhados ao sequenciamento.

1. Digestão enzimática dos vetores de expressão utilizados para transfecção, descritos no Capítulo 1

Para verificar o tamanho dos vetores e do inserto, realizou-se a digestão destes com duas enzimas de restrição (*XhoI* e *HindIII*), seguido de análise por eletroforese em gel de agarose (Figura 39). De acordo com a digestão enzimática, tanto os vetores quanto os insertos apresentaram o tamanho adequado (Figura 44).

Figura 44. Digestão dos vetores com as enzimas de restrição Xho I e Hind III. O vetor controle pCXN2 foi tratado apenas com XhoI (1), apenas com Hind III (2), com ambas as enzimas (3), ou não tratado (4). O vetor pCXN2 contendo RECK foi tratado nas mesmas condições acima (5, 6, 7 e 8, respectivamente).

Para confirmar se o cDNA de RECK inserido no vetor apresentava a sequência correta, realizou-se teste por sequenciamento com o auxílio da Doutora Tatiana Corrêa (Laboratório de Genômica e Elementos Transponíveis, Instituto de Biociências, USP). As sequências geradas foram comparadas ao banco de dados *Standard Nucleotide BLAST* do *NCBI*. Observou-se que o inserto apresenta alta similaridade com a sequência de nucleotídeos do gene RECK disponível no banco de dados, o que indica que, de fato, o vetor contém a sequência correta para esse gene (Figura 45).

Figura 45. Alinhamento das sequências geradas após o sequenciamento do vetor pCXN2 contendo RECK com o banco de dados *Standard Nucleotide BLAST* do *NCBI*, indicando que a sobreposição entre as sequências geradas e a sequência de nucleotídeos do gene RECK disponível no banco de dados é alta (≥ 200). As barras vermelhas representam alta similaridade (100%), e as rosas, boa similaridade (80%).

Para confirmar o tamanho adequado do vetor e do inserto, foi realizada a digestão de FG12-CMV com as enzimas de restrição XhoI e EcoRI, seguida de análise por eletroforese em gel de agarose (Figura 46) e sequenciamento (Figura 47). As sequências geradas pelo sequenciamento foram comparadas ao banco de dados *Standard Nucleotide BLAST* do *NCBI*. Observa-se que o inserto apresenta alta similaridade com a sequência de nucleotídeos do gene RECK disponível no banco de dados, o que indica que, de fato, o vetor contém a sequência correta para esse gene (Figura 47).

Figura 46. Digestão dos vetores com as enzimas XhoI e EcoRI; 1: digestão do vetor FG12-CMV vazio, com a enzima XhoI; 2: digestão do vetor FG12-CMV vazio, com a enzima EcoRI; 3: digestão do vetor FG12-CMV vazio, com as duas enzimas (XhoI e EcoRI); 4: vetor FG12-CMV vazio, sem digestão enzimática; 5: enzimas XhoI e EcoRI, sem nenhum vetor; 6: digestão do vetor FG12-CMV contendo RECK, com a enzima XhoI; 7: digestão do vetor FG12-CMV contendo RECK, com a enzima EcoRI; 8: digestão do vetor FG12-CMV contendo RECK, com as duas enzima (XhoI e EcoRI); 9: vetor FG12-CMV contendo RECK, sem digestão enzimática; 10: enzimas XhoI e EcoRI, sem nenhum vetor.

Figura 47. Alinhamento das sequências geradas após o sequenciamento do vetor FG12-CMV contendo RECK com o banco de dados *Standard Nucleotide BLAST* do *NCBI*, indicando que a sobreposição entre as sequências geradas e a sequência de nucleotídeos do gene RECK disponível no banco de dados é alta (≥ 200). As barras vermelhas representam alta similaridade (100%), e as rosas, boa similaridade (80%).

B) Diferenças entre os protocolos utilizados para superexpressão de RECK através de infecção lentiviral (Tabela 3).

Protocolo	Confluência plaqueamento HEK 293FT (%)	Melo título viral para infecção (mL)	Tempo máximo Polybreen (h)	Saturação do melo HEK 293T	SK-Mel- 28 FG12- CMV positivas (%)	SK-Mel- 28 FG12- CMV+ RECK positivas (%)	SK-Mel- 103 FG12- CMV positivas (%)
1º	90	10	32	Presente	62,5	29,2	82
2º	50-60	6	12	Ausente	89,0	58,1	94,7

ANEXO II

A) Expressão de LC3B na linhagem tumoral WM164, referente ao Capítulo 2

A expressão da proteína lipídica associada a microtúbulo II (LC3-II, também denominada LC3B) foi analisada para avaliar a ativação da autofagia, visto que tal proteína é utilizada como um marcador clássico desse processo, sendo diretamente associada à formação de autofagossomos. A subpopulação clonal WM164 CII apresentou maior expressão de LC3B após tratamento único com vemurafenibe, em comparação com as outras culturas celulares analisadas (Figura 48), indicando processo autofágico em WM164 CII.

Figura 48. Sensibilidade das subpopulações clonais ao vemurafenibe quanto a indução da expressão da proteína autofágica LC3B. O tratamento foi realizado por 72 horas.

Figura 49. Ensaios de caracterização da heterogeneidade tumoral clonal na linhagem parental A375. (A) Morfologia celular das subpopulações clonais por microscopia óptica. (B) Curva de crescimento. (C) Parada no ciclo celular. (D) Migração celular por ensaio de ferida. (E) Indução de apoptose. (F) Expressão proteica de RECK. (G) Crescimento celular independente de coragem. (H) Invasão celular por ensaio de transwell. (I) Migração celular por ensaio de transwell. (J) Ensaio clonogênico.

B) Ensaios realizados com a linhagem tumoral A375, referente ao Capítulo 2

ANEXO OBRIGATÓRIO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

São Paulo, 15 de julho de 2013.

Il^{mo(a)}. S^{r(a)}.

Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria Engler

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos” - **Pesquisador(a) Responsável:** Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria Engler – **Equipe de Pesquisa:** Camila Eduardo Marinho, Carla Abdo Brohem, Manoela Tiago dos Santos, Paula Comune Pennacchi, Paula Anastácia Ferreira, Fernanda Branco Filippin, Guilherme Galvão dos Santos, Renato Ramos Massaro, Bianca Ferruccio - **CEP-HU/USP:** 943/09 – **Registro CAAE:** 0062.0.198.000-09

Prezada Professora

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 05 de julho de 2013, APROVOU o Adendo encaminhado por V.Sa., referente à **inclusão das alunas de pós-graduação: Silvana Sandri, Tatiana do Nascimento Pedrosa, Carolina Motter Catarino, Andréa Costa Fruet e Fernanda Faião Flores**, na equipe de pesquisa.

Aproveitamos também para informar a APROVAÇÃO do Relatório Parcial do referido estudo (período: fevereiro de 2011 a junho de 2013), datado de 27 de junho de 2013.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

São Paulo, 15 de maio de 2015.

Ilmo(a). Sr(a).

Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria Engler

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos"

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria Engler

Equipe de Pesquisa: Camila Eduardo Marinho, Carla Abdo Brohem, Manoela Tiago dos Santos, Paula Comune Pennacchi, Paula Anastácia Ferreira, Fernanda Branco Filippin, Guilherme Galvão dos Santos, Renato Ramos Massaro, Bianca Ferruccio, Silvana Sandri, Tatiana do Nascimento Pedrosa, Carolina Motter Catarino, Andréa Costa Fruct, Fernanda Faião Flores.

CAAE: 0062.0.198.000-09

Registro CEP-HU/USP: 943/09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 15 de maio de 2015, analisou e APROVOU o Relatório Parcial datado de 08 de maio de 2015, referente ao período entre junho de 2013 a maio de 2015.

Reiteramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê relatórios semestrais, de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde, nº 466, de 12 de dezembro de 2012, inciso X.1-3, letra "b". **O próximo relatório esta previsto para 08 de novembro de 2015.**

Atenciosamente,

Dr. Maurício Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

São Paulo, 15 de maio de 2015.

Il^{mo}(a). S^{ra}(a).

Profa. Dra. Silvyia Stuchi Maria Engler

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: Projeto de Pesquisa “Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos”

Pesquisadora responsável: Profa. Dra. Silvyia Stuchi Maria Engler

CAAE: 0062.0.198.000-09

CEP-HU/USP: 943/09

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em Reunião Ordinária realizada no dia 15 de maio de 2015, APROVOU a Emenda datada de 07 de maio de 2015, referente à inclusão das alunas de pós-graduação na equipe de pesquisa: Érica de Oliveira, Thalita Boldrin Zanoni, Débora Kristina Alves e Nayane de Souza. Participam também do estudo como médicos responsáveis: Prof. Dr. José Pinhata Otoch e Dra. Linda Maximiano.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

Manoela Tiago dos Santos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5416861552271735>

Última atualização do currículo em 28/10/2015

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2008). Mestre em Farmácia, área de Análises Clínicas, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (2011). Atualmente é estudante de doutorado pelo mesmo programa de pós-graduação. Tem experiência em cultura de células e reconstrução de ambientes biomiméticos, como equivalente dérmico e pele humana reconstruída in vitro, para prospecção de fármacos e estudo de mecanismos célula tumoral-célula não tumoral e célula-matriz para melanoma. Sua experiência também abrange o estudo de aquisição de quimiorresistência a inibidores de BRAF V600E, como vemurafenibe, em culturas celulares de melanoma metastático que apresentem heterogeneidade tumoral clonal.

(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Manoela Tiago dos Santos
Filiação	José Wilson Tiago dos Santos e Adriana Maria Aguiar dos Santos
Nascimento	07/03/1983 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade	443878675 SSP - SP - 13/01/2015
CPF	310.907.128-20

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
com **período sanduíche** em H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute (Orientador : Keiran S. Smalley)
Título: Metilação dos genes RECK e ALX3 em melanoma humano

Orientador: Silvy Stuchi Maria Engler
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Palavras-chave: expressão gênica, metilação, melanoma, RECK, ALX3, progressão tumoral
Áreas do conhecimento : Citologia e Biologia Celular, Biologia Molecular
Setores de atividade : Saúde humana e serviços sociais
- 2009 - 2011** Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Prospecção de fármacos para melanoma em equivalente dérmico, Ano de obtenção: 2011

Orientador: Silvy Stuchi Maria Engler
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: melanoma, invasão tumoral, polifenóis, apoptose, equivalente dérmico, expressão gênica
Áreas do conhecimento : Biologia Molecular, Análise Toxicológica
Setores de atividade : Saúde e Serviços Sociais
- 2004 - 2008** Graduação em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Terapia gênica para modulação da resposta imune contra o melanoma murino B16F10: utilização de mini-gene do peptídeo P10, forte indutor de IFN-gamma
Orientador: Elaine Guadalupe Rodrigues
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Formação complementar

- 2006 - 2006** Extensão universitária em Biotécnicas de Reprodução Assistida em Animais.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Palavras-chave: reprodução animal assistida
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Desenvolvimento e Utilização de Fitoterápicos.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Fatores Inibidores do Metabolismo de S. cerevisiae.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Extensão universitária em Da Bioética Animal à Preparação de Tecidos.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Extração de DNA.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo
institucional

2009 - Atual Vínculo: Mestrado , Enquadramento funcional: Estudante de pós-graduação , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

2. Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Vínculo institucional

2007 - 2008 Vínculo: Estágio - Iniciação Científica , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 36, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

- 01/2007 - 07/2008

Estágio, Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia

Estágio:
Utilização da enzima proteolítica arazima para ativação de células do sistema imune, no tratamento anti-tumoral do melanoma murino B16F10-Nex2;
- 07/2005 - 07/2005

Estágio, Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX)

Estágio:
Continuação do desenvolvimento do projeto que analisa a possível atividade terapêutica anti-tumoral da enzima proteolítica Arazima em culturas de células de mamíferos.
- 01/2005 - 02/2005

Estágio, Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX)

Estágio:
Aprendizado e aperfeiçoamento de técnicas laboratoriais, como cultivo de células de mamíferos, técnicas bioquímicas, imunológicas e de biologia molecular. Desenvolvimento de projeto para analisar a atividade anti-tumoral da enzima proteolítica Arazim

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Análise Toxicológica
3. Bioquímica
4. Farmácia

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2010 Melhor trabalho de pós-graduação - Mestrado (Apresentação Oral), XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.

[Tiago, Manoela](#), DE OLIVEIRA, EDSON MENDES, [Brohem, Carla Abdo](#), PENNACCHI, PAULA COMUNE, PAES, RAFAEL DUARTE, HAGA, RAQUEL BRANDÃO, CAMPA, ANA, BARROS, SILVIA BERLANGA DE MORAES, SMALLEY, KEIRAN S., [Maria-Engler, Silvy Stuchi](#)

Fibroblasts Protect Melanoma Cells from the Cytotoxic Effects of Doxorubicin. Tissue Engineering. Part A. [JCR](#), v.20, p.140325123503004 - , 2014.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
2.

[Brohem, Carla A.](#), Da Silva Cardeal, Laura B., TIAGO, M., Soengas, Maria S., De Moraes Barros, Silvia B., Maria-Engler, Silvy S., [Maria-Engler, S. S.](#)

Artificial skin in perspective: concepts and applications. PIGM CELL MELANOMA R. [JCR](#), v.24, p.35 - 50, 2011.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital
3.

[Brohem, Carla Abdo](#), Massaro, Renato Ramos, [Tiago, Manoela](#), Marinho, Camila Eduardo, Jasiulionis, Miriam Galvonas, de Almeida, Rebeca Leite, [Rivelli, Diogo Pineda](#), Albuquerque, Renata Chavez, de Oliveira, Tiago Franco, de Melo Loureiro, Ana Paula, Okada, Sabrina, Soengas, Maria S, De Moraes Barros, Silvia Berlanga, [Maria-Engler, Silvy Stuchi](#)

Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. PIGM CELL MELANOMA R. [JCR](#), v.xx, p.no - no, 2012.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-148X.2012.00992.x/abstract?sessionid=3914BD5736BC280DEC8A69871B1A652D.d03t04] [doi:10.1111/j.1755-148X.2012.00992.x]
4.

ZANONI, THALITA B., [Tiago, Manoela](#), FAIÃO-FLORES, FERNANDA, BARROS, SILVIA B DE MORAES, BAST, ALT, HAGEMAN, GEJA, OLIVEIRA, DANIELLE PALMA DE, MARIA-ENGLER, SILVIA S Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3(D) skin model using human keratinocytes (HaCaT). Toxicology Letters. [JCR](#), v.227, p.139 - , 2014.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.toxlet.2014.03.007]
5.

[FAIÃO-FLORES, FERNANDA](#), COELHO, PAULO ROGÉRIO PINTO, TOLEDO ARRUDA-NETO, JOÃO DIAS, [Maria-Engler, Silvy Stuchi](#), [Tiago, Manoela](#), CAPELOZZI, VERA LUIZA, GIORGI, RICARDO RODRIGUES, MARIA, DURVANEI AUGUSTO

Apoptosis through Bcl-2/Bax and Cleaved Caspase Up-Regulation in Melanoma Treated by Boron Neutron Capture Therapy. Plos One. [JCR](#), v.8, p.e59639 - , 2013.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1371/journal.pone.0059639]
6.

PEREIRA, FELIPE V., FERREIRA-GUIMARÃES, CARLA A., PASCHOALIN, THAYSA, SCUTTI, JORGE A. B., MELO, FILIPE M., SILVA, LUIS S., MELO, AMANDA C. L., SILVA, PRISCILA, [Tiago, Manoela](#), MATSUO, ALISSON L., JULIANO, LUIZ, JULIANO, MARIA A., CARMONA, ADRIANA K., TRAVASSOS, LUIZ R., RODRIGUES, ELAINE G.

A Natural Bacterial-Derived Product, the Metalloprotease Arazyme, Inhibits Metastatic Murine Melanoma by Inducing MMP-8 Cross-Reactive Antibodies. Plos One. [JCR](#) v.9, p.e96141 - , 2014.
 Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page:
[\[doi:10.1371/journal.pone.0096141\]](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096141)

7. [doi](#) SANTOS, GLAUCIA CRISTINA MELLO, **Tiago, Manoela, Maria-Engler, Silvy Stuchi**, PINTO, TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI
 Three-Dimensional Systems in Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles Safety Evaluation. International Journal of Polymeric Materials (Print). [JCR](#) v.64, p.695 - 707, 2015.
 Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. PEREIRA, F. V., TIAGO, M., FERREIRA, C. G., CARMONA, A. K., TRAVASSOS, L.R, RODRIGUES, E.G
 Proteases as new anti-tumor therapeutic alternatives: use of arazyme in the treatment of murine melanoma B16F10-Nex2 cells. In: XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology, 2008, Ribeirão Preto.
Anais do XXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology . 2008. v.XX. p.102 - 102
 Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso
2. PEREIRA, F. V., TIAGO, M., CARMONA, A. K., FERREIRA, C. G., TRAVASSOS, L.R, RODRIGUES, E.G
 Novas alternativas terapêuticas anti-tumorais: utilização da enzima proteolítica arazima In: X Encontro Regional de Biomedicina, 2007, Botucatu - SP.
Anais do X Encontro Regional de Biomedicina. Botucatu . 2007. v.XX. p.XX -
 Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro
3. TIAGO, M., RITTNER, G.M.G, TABORDA, C.P, TRAVASSOS, L.R, RODRIGUES, E.G
 Terapia Gênica para modulação da resposta imune contra o melanoma murino B16F10: utilização de mini-gene do peptídeo P10, forte indutor de IFN-gama In: IX Encontro de Biociências e Biotecnologia - UNESP, 2007, Assis.
Anais do IX Encontro de Biociências e Biotecnologia - UNESP . 2007.
 Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

Apresentação de trabalho e palestra

1. **TIAGO, M., Brohem, Carla Abdo**, PAES, R. D., De Moraes Barros, Sílvia Berlanga, **Maria-Engler, Silvy Stuchi**
 Evaluation of the role fo Doxorubicin in the inhibiton of process of tumor invasion of metastatic melanomas cell lines in monolayer, collagen matrix and dermal equivalent models, 2010.
 (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
 Palavras-chave: cultura de células, melanoma, equivalente dérmico, citotoxicidade
 Áreas do conhecimento : Biologia Geral,Biologia Molecular,Análise Toxicológica
 Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico
 Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Evento: XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia
2. TIAGO, M., RITTNER, G.M.G, TABORDA, C.P, TRAVASSOS, L.R, RODRIGUES, E.G
Terapia gênica para modulação da resposta imune contra o melanoma murino B16f10: utilização de mini-gene do peptídeo P10, forte indutor de IFN-gamma, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)
 Palavras-chave: melanoma B16F10, terapia gênica, IFN-gamma, mini-gene, P10
 Áreas do conhecimento : Imunologia Celular
 Setores de atividade : Saúde e Serviços Sociais
 Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso. Home page: www.fema.net/ebba;
 Local: UNESP; Cidade: Assis - SP; Evento: X Encontro de Biociências e Biotecnologia de Assis;
 Inst.promotora/financiadora: UNESP

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **TIAGO, M., Maria-Engler, Silvy Stuchi**
Cultura de células, 2010. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
 Palavras-chave: cultura de células
 Áreas do conhecimento : Biologia Celular
 Setores de atividade : Educação
 Referências adicionais : Brasil/Português. 2 horas. Meio de divulgação: Outro
2. **TIAGO, M., Maria-Engler, Silvy Stuchi**
Cultura de células em mamíferos, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
 Palavras-chave: cultura de células
 Áreas do conhecimento : Biologia Celular
 Setores de atividade : Educação
 Referências adicionais : Brasil/Português. 2 horas. Meio de divulgação: Outro

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **2014 Moffitt Scientific Symposium**, 2014. (Simpósio)
 Melanoma clonal heterogeneity underlies resistance to BRAF inhibitor.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **11th International Congress of the Society for Melanoma Research**, 2014. (Congresso)
 RECK is required for migration and invasiveness in melanoma after vemurafenib treatment.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **10th International Congress of the Society for Melanoma Research**, 2013. (Congresso)
 RECK-tumor suppressor gene is overexpressed in vemurafenib-resistant human melanoma cells.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **9th International Congress of the Society for Melanoma Research**, 2012. (Congresso)
 The protective role of the melanoma microenvironment in the response to chemotherapy and targeted therapy..
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **The 10th International Congress on Cell Biology/16th Sociedade Brasileira de Biologia Celular Meeting**, 2011. (Congresso)
 Dermal equivalent with melanoma as a platform to screening antitumoral molecules.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **8th International Congress of the Society for Melanoma Research**, 2011. (Congresso)
 Using organotypic skin cultures as a platform for screening novel therapeutic agents with anti-melanoma activity.
7. **I Escola Avançada de Nanobiotecnologia com Perspectivas na Medicina**, 2011. (Outra)
 .
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2010. (Simpósio)
 Evaluation of the role of Doxorubicin in the inhibition of process of tumor invasion of metastatic melanoma

cell lines in monolayer, collagen matrix and dermal equivalent models.

9. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular**, 2010. (Congresso)
Evaluation of the role of doxorubicin in the inhibition of process of tumor invasion of metastatic melanomas cell lines in monolayer, collagen matrix and dermal equivalent models.
10. **II Workshop on Melanoma Model: Novel avenues for melanoma treatment**, 2010. (Outra)
11. **A. C. Camargo Global Meeting of Translational Science**, 2010. (Encontro)
12. **Workshop "Emerging novel cytotoxic agents with chemotherapeutic potential: melanoma as a model"**, 2009. (Outra)
13. **8ª Conferência Brasileira sobre Melanoma**, 2009. (Outra)
14. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **IX Encontro de Biociências e Biotecnologia de Assis**, 2007. (Encontro)
TERAPIA GÊNICA PARA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA O MELANOMA MURINO B16F10: UTILIZAÇÃO DE MINI-GENE DO PEPTÍDEO P10, FORTE INDUTOR DE IFN-GAMMA.
15. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **I Fórum de Biotecnologia do Vale do Paranapanema**, 2006. (Outra)
Utilização de Etoricoxib associado a xantana para tratamento no combate úlcera gástrica.
16. **VIII Encontro de Biociências e Biotecnologia de Assis**, 2005. (Encontro)
VIII Encontro de Biociências e Biotecnologia de Assis.
17. **XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2005. (Congresso)
XVII Congresso de Iniciação Científica.

Organização de evento

1. ANDRADE, T.G.C.S., **TIAGO, M.**
I Fórum de Biotecnologia do Vale do Paranapanema, 2006. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários
2. BERTAO, M. R., **TIAGO, M.**
VIII Encontro de Biociências e Biotecnologia de Assis, 2005. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários
3. VARELA, J. A., **TIAGO, M.**
XVII Congresso de Iniciação Científica, 2005. (Congresso, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	7
Trabalhos publicados em anais de eventos	3
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	1
Apresentações de trabalhos (Outra)	1

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (outro)	2
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso)	7
Participações em eventos (simpósio)	2
Participações em eventos (encontro)	3
Participações em eventos (outra)	5
Organização de evento (congresso)	1
Organização de evento (outro)	2

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 28/10/2015 às 09:07:13.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6726056/2 - Manoela Tiago dos Santos

Email: manoela.santos@usp.br
Data de Nascimento: 07/03/1983
Cédula de Identidade: RG - 44.387.867-5 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Biotecnologia - Faculdade de Ciências e Letras - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2008
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 06/07/2011
Início da Contagem de Prazo: 06/07/2011
Data Limite para o Depósito: 03/11/2015
Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria Engler - 06/07/2011 até o presente. Email: silvy@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/07/2011
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 06/07/2015 até 03/11/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/04/2013
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 06/07/2011
Prorrogação em 07/05/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 28/10/2015 05:22:53

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6726056/2 - Manoela Tiago dos Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Disp.	Situação
BMB5818-1/2	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/08/2011	01/09/2011	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
BMA5887-2/1	Princípios de Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética Aplicados à Anatomia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	09/08/2011	17/10/2011	30	2	75	B	N	Concluída
QBQ5860-3/1	Biologia Molecular do Gene (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	01/09/2011	24/11/2011	180	12	100	C	N	Concluída
QBQ5722-4/2	Bioinformática (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	17/10/2011	30/10/2011	60	4	100	A	N	Concluída
QBQ5759-3/5	Tópicos Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular I (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	15/03/2012	28/06/2012	30	2	92	A	N	Concluída
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	20
Estágios:			
Total:	0	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 28/10/2015 05:22:53

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 6726056/2 - Manoela Tiago dos Santos

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
3368462	Silvy Stuchi Maria Engler	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 28/10/2015 05:22:53