

Rafaela Silva Mendonça

**AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES PLAQUETAS-MELANOMA EM EVENTOS  
METASTÁTICOS UTILIZANDO A INSULARINA (GST-INS) COMO MODELO  
DE ESTUDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

SÃO PAULO  
2023

Rafaela Silva Mendonça

**AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES PLAQUETAS-MELANOMA EM EVENTOS  
METASTÁTICOS UTILIZANDO A INSULARINA (GST-INS) COMO MODELO  
DE ESTUDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro

Versão original.

SÃO PAULO  
2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Silva Mendonça, Rafaela

Avaliação das interações plaquetas-melanoma em eventos metastáticos utilizando a insularina (GST-INS) como modelo de estudo / Rafaela Silva Mendonça; orientadora Profa. Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro. -- São Paulo, 2023.

113 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Integrinas. 2. Plaquetas. 3. Melanoma. 4. Células endoteliais. 5. Disintegrinas. I. Faquim de Lima Mauro, Profa. Dra. Eliana, orientador. II. Título.

Candidato (a):

Titulo da Tese: **Avaliação das interações plaquetas-melanoma em eventos metastáticos utilizando a Insularina (GST-INS) como modelo de estudo**

Orientador (a): Profa. Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou a candidato (a):

(    ) **Aprovado (a)**                      (    ) **Reprovado (a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Avaliação das Interações Plaquetas-Melanoma em Eventos Metastáticos Utilizando a Insularina (GST-INS) como Modelo de Estudo

**Pesquisador:** Rafaela Silva Mendonça

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 46237615.0.0000.5467

**Instituição Proponente:** Universidade de São Paulo

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.706.785

**Apresentação do Projeto:**

Não se aplica.

**Objetivo da Pesquisa:**

Não se aplica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não se aplica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Não se aplica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não se aplica.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências ou inadequações.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos

**Endereço:** Av. Profº Lineu Prestes, 2415

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 05.508-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3091-7733

**Fax:** (11)3091-8405

**E-mail:** cep@icb.usp.br



INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.706.785

pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_544061E1.pdf	12/08/2016 10:53:31		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RafaelaMendonca_versaocorrigida.pdf	12/08/2016 10:51:17	Rafaela Silva Mendonça	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	30/06/2016 13:36:39	Rafaela Silva Mendonça	Aceito
Outros	carta_emenda.pdf	30/06/2016 13:32:00	Rafaela Silva Mendonça	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	30/06/2016 13:30:17	Rafaela Silva Mendonça	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPlataformaBrasil_doutorado.pdf	28/06/2016 15:16:07	Rafaela Silva Mendonça	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 31 de Agosto de 2016

Assinado por:  
Camila Squarzoni Dale  
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-000  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3091-7733 Fax: (11)3091-8405 E-mail: cep@icb.usp.br



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEUA.067.2018

São Paulo, 22 de maio de 2018.

Prezado(a) Professor(a),

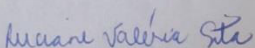
Informo que o projeto intitulado "*Avaliação das integrações plaquetas-melanoma em eventos metastáticos utilizando a insularina (GST-INS) como modelo de estudo*", registrado sob o protocolo nº **012/2014** e aprovado em 07/05/2014 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 07/05/2022**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Camundongo	C57BL/6	Macho	6 semanas	90

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

  
Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Maisa Splendore Della Casa**  
Departamento de **Imunologia**  
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Agradeço imensamente à coordenação do trabalho feita pela Dra. Maisa Splendore Della Casa do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, visto que este trabalho faz parte de sua linha de pesquisa, iniciada e desenvolvida pela mesma, em que estuda a participação de plaquetas em eventos pró-metastáticos bem como a ação de disintegrinas neste contexto.*

*Meu amor, admiração e gratidão por todos os seus ensinamentos e sobretudo a amizade e parceria imensurável que levarei comigo para sempre, na minha trajetória acadêmica e no meu coração.*



*Dedico este trabalho a Deus, autor da minha vida e meu maior apoio nos momentos difíceis.*

*Aos meus pais, Luzia e Edilson, molas propulsoras, fonte inesgotável de amor e doação. Dedico essa tese de doutorado e toda minha jornada acadêmica a vocês! Vocês foram minha força nos dias difíceis e as palavras certas em todos os momentos. Vocês foram minha base nos estudos e na vida. Meu muito obrigada por compartilharem dos meus sonhos e me darem asas para buscar por todos eles!*

*Às minhas irmãs, Gabriela e Isabela, por todo apoio e carinho, pelo companheirismo e incentivo e por serem tão presentes em todos os momentos da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos que de forma direta ou indireta contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

À Ana Beatriz, muito obrigada pelo companheirismo na bancada, pelas discussões em grupo e pelo auxílio na padronização dos ensaios de PCR *Real Time*.

À Elayne, muito obrigada pelo convívio na bancada e pela contribuição na padronização dos ensaios de adesão ao colágeno.

Aos demais colegas do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, muito obrigada pelo apoio e companheirismo em todos estes anos.

Aos membros da banca de qualificação: Dra. Nancy Starobinas, Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni e Dr. João Gustavo Amarantes Mendes, pelas valiosas críticas e sugestões.

À Dra. Jacqueline Jacysyn e Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni pela gentileza em ceder as linhagens celulares utilizadas nos experimentos desse trabalho.

À Dra. Eliana Faquim de Lima Mauro, muito obrigada pela amizade, pelo incentivo, gentileza e valiosa contribuição na leitura da tese.

À Dra. Patrícia Bianca Clissa, muito obrigada pela amizade e colaboração na metodologia, análise e discussão dos resultados de PCR *Real time*.

Ao diretor do Laboratório de Imunopatologia Dr. Geraldo Santana Magalhães, pela disponibilidade de muitos reagentes e materiais, além das discussões sempre construtivas que colaboraram com esse trabalho.

À Dra. Ana Maria Moura, agradeço o suporte experimental e as boas conversas.

À secretária do Laboratório de Imunopatologia e grande amiga, sempre presente, Cleusa, minha gratidão pelo suporte administrativo, amizade, conversas, almoços, cafés e as boas risadas. Sentirei saudades!

À secretária do Laboratório de Imunopatologia, Camila, pelo suporte administrativo e pela amizade.

À Mônica Colombini, Bianca Távora, Paula Calabria, José Portes, Luciana Sousa e Daniele Oréfice pela convivência no laboratório e suporte experimental.

À auxiliar do Laboratório de Imunopatologia e amiga, Cristiane, obrigada pela amizade, carinho e todo apoio.

Aos técnicos, auxiliares e demais funcionários do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, obrigada pela colaboração na rotina de trabalho.

Ao Departamento de Imunologia/ICB-USP pelas oportunidades. Em especial a Eni, pelo seu importante apoio e disponibilidade.

Agradeço também aos docentes do Departamento de Imunologia/ICB-USP, em especial aos meus supervisores PAE (Programa de Aperfeiçoamento de Ensino), Dra. Ana Paula Lepique, Dr. Anderson Sá Nunes, Dra. Sônia Jancar, Dr. José Alvarez Mosig, Dra. Vera Calich e Dr. Antônio Condino.

Ao Instituto Butantan por ter me aberto às portas.

A CAPES pelo consentimento da Bolsa de Doutorado.

A FAPESP pelo auxílio financeiro.

Muito obrigada!

**O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de  
Imunopatologia do Instituto Butantan e teve como suporte financeiro a  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
(CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
(FAPESP).**

*“Construa uma vida que faça sentido, que tenha propósito, que te preencha. Viva por tudo aquilo que você acredita. Mantenha-se fiel aos seus valores, aos seus princípios. Honre e orgulhe-se das suas raízes. Não espere ninguém te salvar. Não terceirize a sua felicidade. Faça acontecer por você, para você. Daqui alguns anos, ninguém se lembrará das suas escolhas, exceto você”.*

*Wandy Luz*

## RESUMO

SILVA-MENDONÇA, R. **Avaliação das interações plaquetas-melanoma em eventos metastáticos utilizando a insularina (GST-INS) como modelo de estudo**. 2023. 113 f. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Integrinas  $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_{IIb}\beta_3$  promovem a interação entre plaqueta-melanoma e melanoma-microambiente. A insularina (GST-INS) é uma disintegrina recombinante que inibe as integrinas  $\alpha_{IIb}\beta_3$  presentes na superfície das plaquetas, e  $\alpha_v\beta_3$  presentes em células endoteliais e tumorais. Essas integrinas participam dos mecanismos de metástase e invasão tumoral. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o papel das membranas plaquetárias (MP), utilizando como modelo de estudo células de melanoma humano SK-MEL-28 (ME), além de verificar a ação da GST-INS, nesses eventos. Para isso em placas de cultura com Matrigel foram adicionadas às células ME ou HUVECs, pré-tratadas com GST-INS, GST ou Aggrastat®, na presença de MP. Para o ensaio de invasão tumoral, utilizou-se o *transwell* onde as células ME foram pré-incubadas com as mesmas proteínas, na presença de MP por 48 hs. Para o ensaio de competição, células ME foram pré-tratadas com GST-INS e adicionadas à placa sob componentes da matriz ou com colágeno I na forma íntegra, ou desnaturada por pH ou termicamente. Nossos resultados mostraram que células ME ou HUVECs tratadas pela MP, apresentam uma morfologia migratória em relação as células não estimuladas. Diferentemente, em amostras incubadas com GST-INS, as células ME ou células HUVECs foram incapazes de formar túbulos. Além disso, células ME incubadas com MP tornaram-se mais invasivas. Porém, GST-INS inibiu a capacidade de invasão dessas células ao Matrigel. Já no ensaio de competição com diferentes ligantes da matriz extracelular a GST-INS também foi capaz de inibir a adesão de ME ao fibrinogênio e ao colágeno tipo I. Ao comparar a adesão de células ME ao colágeno I na forma íntegra ou desnaturada, a GST-INS apresentou maior inibição na adesão de ME ao colágeno desnaturado. Tal resultado, provavelmente é decorrente do fato de que o colágeno desnaturado expõe a sequência RGD, reconhecida pelas integrinas  $\alpha_v\beta_3$ ,

diferentemente do colágeno íntegro, onde a sequência RGD não é acessível. Entretanto, a incubação das ME com MP estimularam a adesão celular ao colágeno íntegro, sugerindo a liberação de MMPs pelas células estimuladas, hidrolisando o colágeno e, conseqüentemente expondo o sítio de ligação, favorecendo a adesão das ME ao colágeno íntegro. Os ensaios de expressão gênica, demonstraram que células ME incubadas com MP apresentam maior expressão de MMP-9, Ang-2 e TGF- $\beta$ , em relação a expressão das células ME não estimuladas por MP. Por outro lado, GST-INS modulou negativamente a expressão desses genes, mesmo na vigência do estímulo com MP, o que explicaria a inibição dos eventos avaliados. Assim, o bloqueio simultâneo da integrina de MP,  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  e da integrina  $\alpha_v\beta_3$  pela GST-INS impede o contato de MP com as células ME ou HUVECs, importantes para a vasculogênese, angiogênese, adesão à matriz extracelular e para a invasão tumoral. Além disso, a inibição dos eventos estudados é suportada pela modulação negativa da GST-INS na expressão de genes relacionados a fenótipos pró-metastáticos como Ang-2, MMP-9 e TGF- $\beta$ . Dessa forma, a GST-INS torna-se uma potencial ferramenta para o desenvolvimento de antagonistas de integrinas que atuem na progressão tumoral dependente de plaquetas.

**Palavras-chave:** Integrinas. Plaquetas. Melanoma. Células endoteliais. Disintegrina.

## ABSTRACT

SILVA-MENDONÇA, R. **Evaluation of platelet-melanoma interactions in metastatic events using insularin (GST-INS) as a study model.** 2023. 113 f. Ph. D. these (Immunology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Integrins  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha IIb\beta 3$  promote the interaction between platelet-melanoma and melanoma-microenvironment. Insularin (GST-INS) is a recombinant disintegrin that inhibits  $\alpha IIb\beta 3$  integrins present on the surface of platelets, and  $\alpha v\beta 3$  present in endothelial and tumor cells. These integrins participate in the mechanisms of metastasis and tumor invasion. Thus, the objective of this work was to verify the role of platelet membranes (PM), using human melanoma cells SK-MEL-28 (ME) as a study model, in addition to verifying the action of GST-INS in these events. For this, culture plates with Matrigel were added to ME cells or HUVECs, pretreated with GST-INS, GST or Aggrastat®, in the presence of PM. For the tumor invasion assay, the transwell was used where the ME cells were pre-incubated with the same proteins, in the presence of PM for 48 hs. For the competition assay, ME cells were pretreated with GST-INS and added to the plate under matrix components or with collagen I in full form, or denatured by pH or thermally. Our results showed that ME cells or HUVECs stimulated by PM present a migratory morphology in relation to non-stimulated cells. In differently, in samples incubated with GST-INS, ME cells or HUVEC cells were unable to form tubules. In addition, ME cells incubated with PM have become more invasive. However, GST-INS inhibited the ability of these cells to break into matrigel. In the competition assay with different extracellular matrix ligands, GST-INS was also able to inhibit the me's adhering to fibrinogen and type I collagen. This result is probably due to the fact that denatured collagen exposes the RGD sequence, recognized by  $\alpha v\beta 3$  integrins, unlike intact collagen, where the RGD sequence is not accessible. However, the incubation of ME with MP stimulated cellular adhering to intact collagen, suggesting the release of MMPs by stimulated cells, hydrolysing collagen and, consequently exposing the binding site, favoring the adhering of ME to



intact collagen. Gene expression assays demonstrated that ME cells incubated with MP present higher expression of MMP-9, Ang-2 and TGF- $\beta$ , in relation to the expression of ME cells not stimulated by PM. On the other hand, GST-INS negatively modulated the expression of these genes, even in the presence of the stimulus with PM, which would explain the inhibition of the evaluated events. Thus, the simultaneous blockade of PM integrin,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 by GST-INS prevents PM contact with ME or HUVECs cells, important for vasculogenesis, angiogenesis, extracellular matrix adhesion and tumor invasion. In addition, inhibition of the studied events is supported by negative modulation of GST-INS in the expression of genes related to prometastatic phenotypes such as Ang-2, MMP-9 and TGF- $\beta$ . Thus, GST-INS becomes a potential tool for the development of antagonists that act on platelet-dependent tumor progression.

**Key words:** Integrins. Platelets. Melanoma. Endothelial cells. Disintegrin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema representando a estrutura da pele.....	27
<b>Figura 2</b> - Microambiente tumoral.....	29
<b>Figura 3</b> - Matrix extracelular associada a tumores sólidos.....	30
<b>Figura 4</b> - Receptores e ligantes de integrinas.....	32
<b>Figura 5</b> - O papel das plaquetas na metástase tumoral.....	34
<b>Figura 6</b> - Trombose associada ao câncer.....	36
<b>Figura 7</b> - Esquema representativo da expressão e purificação da proteína recombinante GST-INS.....	50
<b>Figura 8</b> - Ensaio de agregação plaquetária (A) no agregômetro e seu registro experimental (B).....	52
<b>Figura 9</b> - Esquema representativo do ensaio de agregação plaquetária.....	52
<b>Figura 10</b> - Esquema representativo da técnica de obtenção de membranas plaquetárias.....	54
<b>Figura 11</b> - Esquema representativo do ensaio de adesão celular a diferentes ligantes.....	56
<b>Figura 12</b> - Esquema representativo do ensaio de adesão ao colágeno I.....	58
<b>Figura 13</b> - Esquema representativo do ensaio de formação de túbulos na presença de MP.....	60
<b>Figura 14</b> - Esquema representativo do ensaio de invasão tumoral na presença de MP.....	61
<b>Figura 15</b> - Esquema representativo do ensaio de PCR <i>Real Time</i> .....	64
<b>Figura 16</b> - Gel de poliacrilamida da proteína GST-INS.....	66

<b>Figura 17</b> - Avaliação da ação da proteína GST-INS na inibição da agregação plaquetária induzida por ADP.....	67
<b>Figura 18</b> - Avaliação da ação da proteína GST-INS na inibição de 50% da agregação plaquetária induzida por ADP.....	68
<b>Figura 19</b> - Análise morfológica de células SK-MEL-28 frente a diferentes componentes de matriz utilizando microscópio de contraste de fase.....	70
<b>Figura 20</b> - Efeito inibitório da GST-INS sobre a SK-MEL28 em diferentes componentes de matriz.....	71
<b>Figura 21</b> - Efeito inibitório da GST-INS sobre a adesão de SK-MEL-28 ao colágeno I na forma íntegra.....	73
<b>Figura 22</b> - Efeito inibitório da GST-INS sobre a adesão de SK-MEL-28 ao colágeno desnaturado (pH 6,0).....	75
<b>Figura 23</b> - Efeito inibitório da GST-INS sobre a adesão de SK-MEL-28 ao colágeno desnaturado termicamente.....	76
<b>Figura 24</b> - Efeito inibitório da GST-INS sobre a adesão de SK-MEL-28 estimuladas com MP ao colágeno I.....	77
<b>Figura 25</b> - Análise da capacidade da proteína GST-INS na inibição da formação de túbulos por células HUVECs, em substrato de matrigel, através de microscopia de contraste de fase.....	79
<b>Figura 26</b> - Avaliação do efeito inibitório de GST-INS na formação de túbulos por células SK-MEL-28, na presença de MP, ao matrigel através de microscopia de contraste de fase (48hs).....	81
<b>Figura 27</b> - Avaliação do efeito inibitório de GST-INS na formação de túbulos por células SK-MEL-28, na presença de MP, ao matrigel através de microscopia de contraste de fase (72hs).....	83
<b>Figura 28</b> - Avaliação do efeito inibitório de GST-INS na formação de túbulos por células SK-MEL-28, na presença de MP, ao matrigel através de microscopia de contraste de fase (120hs).....	85
<b>Figura 29</b> - Avaliação do efeito inibitório de GST-INS na invasão de células SK-MEL-28, na presença de MP, ao matrigel, através de microscopia de contraste de fase.....	87

<b>Figura 30</b> - Análise quantitativa da invasão de SK-MEL-28, na presença de MP, tratadas com GST-INS.....	87
<b>Figura 31</b> - Efeito inibitório da GST-INS sobre a expressão gênica de Ang-2 em células SK-MEL-28 na presença de MP.....	89
<b>Figura 32</b> - Efeito inibitório da GST-INS sobre a expressão gênica de MMP-9 em células SK-MEL-28 na presença de MP.....	90
<b>Figura 33</b> - Efeito inibitório da GST-INS sobre a expressão gênica de TGF- $\beta$ em células SK-MEL-28 na presença de MP.....	90
<b>Figura 34</b> - Efeito inibitório da GST-INS sobre a expressão gênica de NF- $\kappa$ B em células SK-MEL-28 na presença de MP.....	91

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Listagem de células utilizadas nos experimentos e suas especificações.....	54
<b>Tabela 2-</b> Listagem de <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR <i>Real Time</i> .....	64
<b>Tabela 3-</b> Valores correspondentes ao Ct limite de ciclo ( <i>cycle threshold</i> ) dos genes avaliados das células tumorais, estimuladas ou não, com membranas plaquetárias.....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADP** *Adenosine Diphosphate* (Adenosina Difosfato)

**AKT** *Protein Kinase B* (Proteína Quinase B)

**ANG-1** *Angiopoietin 1* (Angiopoietina 1)

**ANG-2** *Angiopoietin 2* (Angiopoietina 2)

**AGG-** Aggrastat®

**bFGF** *Basic fibroblast growth factor* (Fator de Crescimento Fibroblástico Básico)

**BSA** *Bovine serum albumin* (Albumina Sérica Bovina)

**COL** Colágeno

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DNA** Ácido Desoxirribonucleico

**ERK** *Extracellular Signal-Regulated Kinases* (Quinases Reguladas por Sinalização Extracelular)

**FAK** *Focal adhesion kinase* (Quinase de Adesão Focal)

**GST** Glutathione S Transferase

**GST-INS** Insularina recombinante fusionada a Glutathione S Transferase

**IC50** Concentração de inibição de 50% da inibição máxima

**MEC** Matriz Extracelular

**MAPK** *Mitogen activated protein kinase* (Proteínas Quinases Ativadas Mitógenos)

**MEC** Matriz Extracelular

**MEK** *Mitogen-activated protein kinase kinase* (Proteína Quinase Quinase Ativada por Mitógeno)

**MMPs** Metaloproteinases

**MMP-2** Matrix metalloproteinases-1 (Metaloproteinase de Matriz 1)

**MMP-2** Matrix metalloproteinases-2 (Metaloproteinase de Matriz 2)

**MMP-9** Matrix metalloproteinases-9 (Metaloproteinase de Matriz 9)

**MP** Membrana plaquetária ativada por trombina

**MTT** Brometo de (3- (4,5- dimetiltiazol - 2-il) -2,5 difeniltetrazólio

**NF- $\kappa$ B** *Nuclear factor kappa B* (Fator Nuclear kappa B)

**PPP** Plasma Pobre em Plaqueta

**PRP** Plasma Rico em Plaqueta

**P53** *Protein 53* (Fosfoproteína nuclear que codifica gene supressor de tumor)

**PAGE** *Polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de Poliacilamida)

**PBS** *Phosphate saline buffer* (Tampão fosfato salino)

**PCR** *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia Polimerase)

**PI3K** *Phosphoinositide 3-kinase* (Fosfoinosítideo 3-quinase)

**RAF** *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* (Proteína Quinase Treonina/Serina)

**RAS** *Rat sarcoma* (Proteína oncogênicas identificadas inicialmente em vírus sarcoma de rato)

**RGD** Arginina /Glicina/ Ácido Aspártico

**RNA** Ácido Ribonucleico

**RT-PCR** *Reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia Polimerase)

**SBF** *Serum bovine fetal* (Soro Fetal Bovino)

**SDS** *Sodium dodecyl sulfato* (Dodecil Sulfato de Sódio)

**SK-MEL-28** Linhagem de células de melanoma humano

**TCIPA** *Tumour cell-induced platelet aggregation* (Agregação Plaquetária Induzida por Células Tumorais)

**TEM** *Epithelial-mesenchymal transition* (Transição Epitélio Mesênquima)

**TGF- $\beta$**  *Transforming growth factor beta* (Fator de crescimento transformador beta)

**UV** Ultravioleta

**VEGF** *Vascular epithelial growth factor* (Fator de Crescimento de Epitélio Vascular)

**VM** *Vacuogenic mimicry* (Mimetismo vasculogênico)



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
2.1 Geral.....	47
2.2 Específicos.....	47
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Expressão e purificação da insularina recombinante GST-INS e da proteína controle GST.....</b>	<b>49</b>
<b>3.2 Eletroforese das proteínas recombinantes em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....</b>	<b>50</b>
<b>3.3 Ensaio de Agregometria.....</b>	<b>51</b>
<b>3.4 Obtenção das membranas plaquetárias (MP).....</b>	<b>53</b>
<b>3.5 Linhagens Celulares.....</b>	<b>54</b>
3.5.1 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.....	55
<b>3.6 Ensaio de adesão de células SK-MEL-28 a diferentes componentes de matriz.....</b>	<b>55</b>
<b>3.7 Ensaio de adesão celular de SK-MEL-28 em colágeno I na forma íntegra e desnaturada.....</b>	<b>56</b>
<b>3.8 Ensaio de adesão celular de SK-MEL-28 na presença de MP em colágeno I.....</b>	<b>58</b>
<b>3.9 Ensaio de formação de túbulos <i>in vitro</i> por células de melanoma e por células endoteliais na presença de MP.....</b>	<b>59</b>
<b>3.10 Ensaio de invasão celular na presença de MP.....</b>	<b>60</b>
<b>3.11 Ensaio de expressão gênica de Ang-2, MMP-9, TGF-<math>\beta</math> e NF-<math>\kappa</math>B por células SK-MEL-28 co-cultivadas com membranas plaquetárias.....</b>	<b>61</b>
3.11.1 Condições experimentais.....	61
3.11.2 Extração de RNA total.....	62
3.11.3 Reação de Transcrição Reversa (RT).....	63

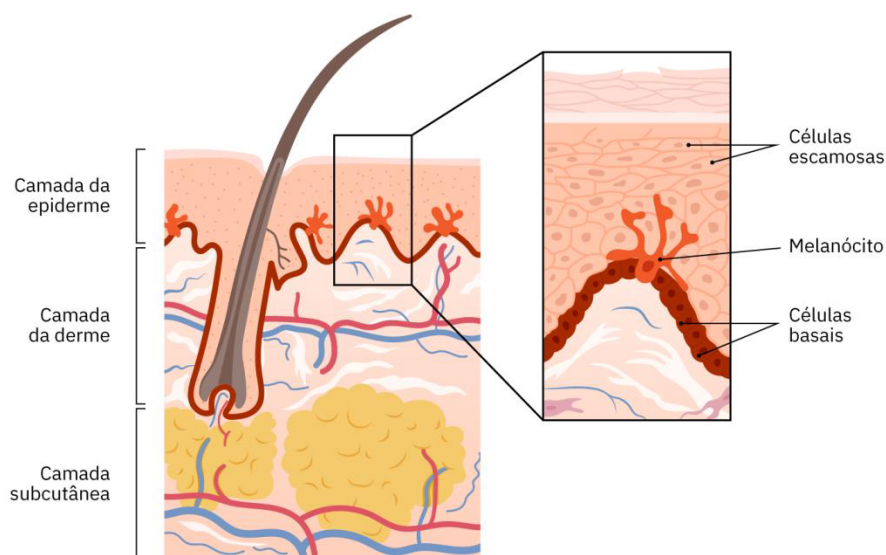
3.11.4 Expressão gênica por PCR em tempo real.....	63
3.12 Análises Estatísticas.....	65
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
4.1 Quantificação das proteínas recombinantes GST-INS.....	66
4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína GST-INS.....	66
4.3 Avaliação do efeito inibitório da GST-INS na agregação plaquetária.....	67
4.4 Avaliação do efeito inibitório da GST-INS na adesão de células SK-MEL-28 a diferentes ligantes de matriz extracelular.....	69
4.5 Avaliação do efeito inibitório da GST-INS na adesão de células SK-MEL-28 ao colágeno íntegro.....	72
4.6 Avaliação do efeito inibitório da GST-INS na adesão de células SK-MEL-28 ao colágeno desnaturado.....	73
4.7 Avaliação do efeito inibitório da GST-INS na adesão de células SK-MEL-28, na presença de MP em colágeno I.....	76
4.8 Avaliação do efeito inibitório da GST-INS na inibição da formação de túbulos por células HUVECs, na presença de MP, em matrigel.....	77
4.9 Avaliação do efeito inibitório da GST-INS na inibição da formação de túbulos por células SK-MEL-28, na presença de MP, em matrigel.....	80
4.10 Avaliação do efeito inibitório da GST-INS na invasão de células SK-MEL-28 em substrato de matrigel.....	86
4.11 Análise da expressão gênica de Ang-2, MMP-9, TGF- $\beta$ e NF- $\kappa$ B por células SK-MEL-28 co-cultivadas com membranas plaquetárias (MP).....	88
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1 Melanoma e microambiente tumoral

O melanoma cutâneo é caracterizado pela formação de células malignas oriundas de melanócitos. Os melanócitos localizam-se na camada basal da epiderme e são células produtoras de melanina, a qual é distribuída para as camadas superiores, dando origem à cor da pele (Figura 1). Além disso, a melanina atua como barreira protetora contra a radiação UV, impedindo alterações no DNA celular (CUCÉ; FESTA-NETO, 2001; LEONARDI et al., 2018). Trata-se de uma doença multifatorial, decorrente de interações entre a suscetibilidade genética e a exposição a agentes ambientais.

**Figura 1-** Esquema representando a estrutura da pele



Principais tipos celulares (células escamosas, células basais e melanócitos) que constituem as camadas da pele (epiderme e derme).

Fonte: Adaptado de Mendelics, 2022.

O câncer de pele do tipo melanoma embora possua uma baixa frequência (~ 4%) apresenta alta letalidade (~80%), sendo jovens adultos o principal grupo acometido

pela doença, com prognóstico de morte de 6-9 meses e sobrevida por mais de 3 anos inferior a 15% (BALCH et al., 2009; NIKOLAOU *et. al.*, 2012, ALI et al., 2013).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no triênio 2023-2025, são esperados 220.490 novos casos anuais de câncer de pele do tipo não melanoma e 13.620 novos casos anuais de melanoma. O melanoma é considerado uma importante questão de saúde pública, pois embora apresente baixa incidência, possui uma alta taxa de mortalidade, sendo 4 entre 10 mortes por tumores de pele (INCA, 2022).

Enquanto a incidência de diversos tipos de tumores tem diminuído, a ocorrência no número de casos de melanoma maligno vem crescendo. Apesar do avanço nas pesquisas acerca do melanoma, as opções de tratamento ainda são limitadas para pacientes em estágios avançados da doença (RASTRELLI et al. 2014).

As principais vias de sinalização intracelulares relacionadas à patogênese do melanoma são: a MAPK clássica (*Mitogen activated protein kinase*- cascata de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK) e a via PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*), sendo ambas recentemente estudadas como estratégia farmacológica (PALUNCIC et al., 2016; LEONARDI et al., 2018).

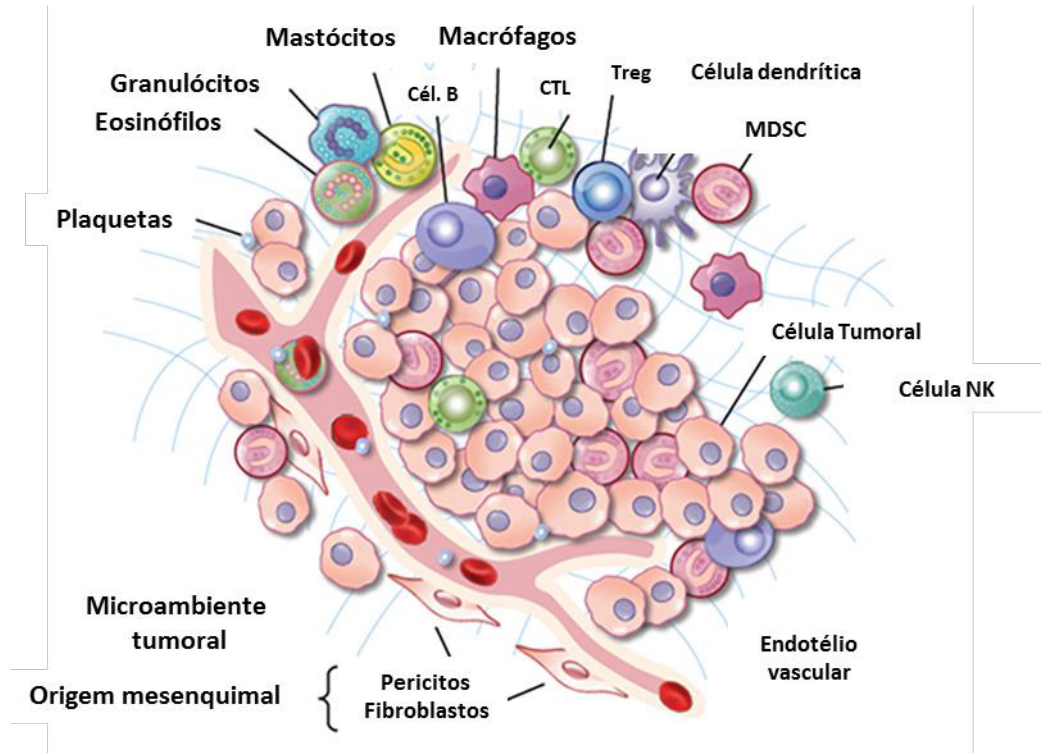
A via MAPK está envolvida na transdução de sinais hormonais extracelulares e de fatores de crescimento, ativando a expressão de genes centrais relacionados à proliferação, diferenciação e sobrevivência da célula (WELLBROCK et al., 2004; RAMAN et al., 2007). A via PI3K encontra-se ativa em diferentes tipos de câncer, tendo papel central no crescimento, proliferação, sobrevivência e motilidade celular (DAVIES, 2002; SMALLEY, 2010).

As interações entre as células de melanoma e o microambiente tecidual, principalmente com as proteínas encontradas na matriz extracelular (MEC), indicam que a MEC exerce papel fundamental na progressão tumoral (KOENING; LANGFORD, 2006; LIN; YUN, 2010).

A matriz extracelular que compõe o microambiente tumoral (Figura 2), regula a homeostase da tensão tecidual entre as células tumorais e o estroma. Além disso, a MEC também induz sinalizações bioquímicas que afetam a adesão e a motilidade celular, a morfogênese, o reparo tecidual e a angiogênese. A proteólise da MEC é

regulada em tecidos normais, mas descontrolada no ambiente tumoral (FANG et al., 2014).

**Figura 2-** Microambiente tumoral



Em um tumor, além das células cancerígenas, diferentes tipos celulares que incluem células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, células supressoras derivadas da linhagem mielóide (CSDM), plaquetas, linfócitos e granulócitos compõem o complexo microambiente tumoral, favorecendo seu crescimento e extravasamento.

Adaptado de Roche®, 2017.

A estrutura bioquímica da MEC é alterada durante o desenvolvimento do tumor, que inclui: 1) aumento na deposição de proteoglicanos, fibronectina e colágenos do tipo I, III e IV; 2) aumento da reticulação (rigidez) da matriz.

Durante a progressão tumoral as células de melanoma entram em contato com diferentes tipos de MEC, sendo o colágeno o principal elemento. A remodelação do colágeno, através de metaloproteinases (MMPs), é fundamental para a progressão e metástase do melanoma (THERET et al., 2001; BEDOYA et al., 2016; MISKOLCZI et al., 2018). Autores relatam que tanto o aumento, como a diminuição da deposição de colágeno, está correlacionado com a malignidade tumoral (FANG et al., 2014).