

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)**  
**Área de Fisiopatologia**

Peroxirredoxina 2 na modulação do fenótipo invasivo em melanoma com  
mutação em NRAS

Isabella Harumi Yonehara Noma

Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Orientadora:  
Profa. Dra. Silvy Maria Stuchi Engler

**São Paulo**  
**2023**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)**  
**Área de Fisiopatologia**

Peroxirredoxina 2 na modulação do fenótipo invasivo em melanoma com  
mutação em NRAS

Isabella Harumi Yonehara Noma

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Orientadora:  
Profa. Dra. Silvy Maria Stuchi Engler

**São Paulo**  
**2023**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

N799p Noma, Isabella Harumi Yonehara  
Peroxirredoxina 2 na modulação do fenótipo  
invasivo em melanoma com mutação em NRAS / Isabella  
Harumi Yonehara Noma. - São Paulo, 2023.  
111 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Farmácia.  
Orientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi

1. Melanoma. 2. Antioxidantes. 3. Biologia  
celular. 4. Invasão celular. 5. Câncer. I. T. II.  
Maria-Engler, Silvy Stuchi, orientador.



Isabella Harumi Yonehara Noma

Peroxirredoxina 2 na modulação do fenótipo invasivo em melanoma com  
mutação em NRAS

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Prof. Dr. Orientador/presidente:

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

---

4º examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar suporte e coragem para seguir todo esse caminho de aprendizado,

Agradeço a minha família e ao meu namorado pela ajuda, todo suporte emocional e incentivo para conseguir conquistar e buscar todos os meus objetivos,

Agradeço a todos os amigos que estiveram presentes ou à distância sempre dando apoio e torcendo pelas minhas conquistas,

Agradeço a orientação da professora Silvy Stuchi durante todo o doutorado, por estar sempre disposta e disponível para tudo o que for necessário, por incentivar os experimentos e estar sempre atenta e cuidadosa durante todo o tempo,

Agradeço a todo laboratório de Fisiopatologia da pele por toda ajuda, companheirismo, amizades e suporte diariamente. Em especial a Larissa Anastácio por ensinar todos os experimentos, por sua amizade e ajuda de sempre; Manoel Oliveira, Renaira Oliveira, Denisse Camarena e Sophia Tavares por colaborarem nos experimentos, pela parceria e amizade,

A todos do laboratório: Julia Rezende, Julia Bagatin, Walter Turato, Silvia Romano, Professora Silvia Berlanga, Andressa, Rodrigo Queijo, Ylana que estiveram presentes durante essa jornada e foram essenciais ajudando de forma direta ou indiretamente,

Agradeço aos colaboradores do projeto o Professor Jérémie Nsengimana e Professora Julia-Newton Bishop (Escola de Medicina da Universidade de Leeds e Universidade de Newcastle),

Agradeço à secretaria, em especial a Elaine, Edna e Samanta e ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia), da Universidade de São Paulo,

Agradeço a todas as agências financiadoras: FAPESP (18/14936-1 e 17/04926-6) e CNPq (#408769/2018, #304339/2017-2 e 142058/2020-3).

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

## EPÍGRAFE

“Deus quer mais de ti um mínimo de obediência e docilidade,  
do que todas as ações que realizas por ele”

São João da Cruz

“É justo que muito custe o que muito vale”

Santa Teresa D’Ávila

## RESUMO

NOMA, I. H. Y. **Peroxirredoxina 2 na modulação do fenótipo invasivo em melanoma com mutação em NRAS**. 2023. Tese (Doutorado em Ciências – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023).

O melanoma é o câncer de pele mais letal, com taxa de mortalidade de aproximadamente 20% dentre todos os novos casos diagnosticados anualmente. Os principais fatores de risco incluem a exposição à radiação ultravioleta e a predisposição genética. O acúmulo de mutações em nevos melanocíticos predispõe ao desenvolvimento do tumor, sendo a mutação mais comum em BRAF (B-Raf Proto-Oncogene, Serina/Treonina Quinase), presente em cerca de 50% dos casos, seguida pela mutação em NRAS (Homólogo de oncogene viral RAS de neuroblastoma), que representa cerca de 20% dos casos e é associada a um pior prognóstico devido ao aumento das taxas de invasão e metástases. Infelizmente, ainda não há terapias direcionadas para o melanoma com mutação em NRAS, como já existe para pacientes com a mutação em BRAF, que possuem a terapia alvo dirigida. Em busca de possíveis alvos terapêuticos, há estudos relatando a ação de enzimas antioxidantes, como as peroxirredoxinas (PRDX), alterando a homeostase redox intracelular e a tumorigênese. A isoforma PRDX2 já foi estudada em outros tipos de cânceres, pois é capaz de reduzir peróxidos na presença de NADPH pelo acoplamento ao sistema tiorredoxina/tiorredoxina redutase. Curiosamente, a PRDX2 é pouco expressa em melanoma metastático e possui a capacidade de induzir a estabilização de junções aderentes em melanoma com mutação em BRAF. Desse modo, o objetivo do trabalho foi investigar o papel da PRDX2 em melanoma com mutação em NRAS como possível biomarcador e/ou alvo terapêutico. Foi realizado o silenciamento (*shRNA*) de PRDX2 e o uso de um mimético farmacológico de PRDX2 (Gliotoxina) para verificar seu potencial na proliferação, migração e invasão celular. Além disso, foram feitas análises *in silico* em tumores de melanoma primário, comparando a expressão da PRDX2 com marcadores e características clínicas relacionadas à progressão do tumor. Os resultados obtidos demonstraram que PRDX2 está mais expressa em melanoma proliferativo do que em melanoma invasivo, e está correlacionada negativamente com marcadores de transição epitélio-mesênquima (N-caderina, Snail, Smad) e regulado positivamente com marcadores de estabilização celular e proliferação (MITF,  $\beta$ -catenina, Queratina). Em experimentos com a gliotoxina, observou-se a capacidade de reduzir a migração em células de melanoma NRAS mutante. As células de melanoma NRAS mutante com baixa expressão de PRDX2 apresentaram sítios de invasão na pele humana reconstruída, confirmando seu potencial invasivo. Os dados *in silico* de pacientes com melanoma primário com maior expressão PRDX2, apresentaram menor estadiamento do tumor e aumento de sobrevida. Portanto, a PRDX2 pode ser um possível biomarcador e/ou alvo terapêutico para pacientes com melanoma NRAS mutante invasivo.

**Palavras-chaves:** melanoma, NRAS, peroxirredoxina, metástase, modulação fenotípica.



## ABSTRACT

NOMA, I. H. Y. **Peroxiredoxin 2 in the modulation of the invasive phenotype in NRAS-mutated melanoma**. 2023. Tese (Doutorado em Ciências – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023).

The melanoma is the deadliest skin cancer, with a mortality rate of approximately 20% among all new cases diagnosed annually. The main risk factors include exposure to ultraviolet radiation and genetic predisposition. The accumulation of mutations in melanocytic nevi predisposes tumor development, with the most common mutation in BRAF (B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase), present in about 50% of cases, followed by mutation in NRAS (NRAS Proto-Oncogene, GTPase), which represents about 20% of cases and is associated with worse prognosis due to increased rates of invasion and metastases. Unfortunately, there are still no targeted therapies for NRAS-mutated melanoma, as there already is for patients with BRAF-mutated melanoma. In search of possible therapeutic targets, there are already studies reporting the action of antioxidant enzymes, such as peroxiredoxins (PRDX), altering intracellular redox homeostasis and tumorigenesis. The PRDX2 isoform has already been studied in other types of cancers, as it is capable of reducing peroxides in the presence of NADPH by coupling to the thioredoxin/thioredoxin reductase system. Interestingly, PRDX2 is poorly expressed in metastatic melanoma and has the ability to induce stabilization of adherent junctions in BRAF-mutated melanoma. Thus, the aim of this study was to investigate the role of PRDX2 in NRAS-mutated melanoma as a possible biomarker and/or therapeutic target. Gene editing (shRNA) was performed to silence PRDX2 and the use of a pharmacological mimetic of PRDX2 (Gliotoxin) to verify its potential in cell proliferation, migration and invasion. In addition, *in silico* analyses were performed on primary melanoma tumors, comparing PRDX2 expression with markers and clinical characteristics related to tumor progression. The results obtained demonstrated that PRDX2 is more expressed in proliferative melanoma than in invasive melanoma, is negatively correlated with markers of epithelial-mesenchymal transition (N-cadherin, Snail, Smad) and positively regulated with markers of cell stabilization and proliferation (MITF,  $\beta$ -catenin, Keratin). In experiments with gliotoxin, the ability to reduce migration in NRAS-mutated melanoma cells was observed. NRAS-mutated melanoma cells with low expression of PRDX2 showed invasion sites in reconstructed human skin, confirming their invasive potential. *In silico* data from patients with primary melanoma with higher PRDX2 expression showed lower tumor staging and increased survival. Therefore, PRDX2 may be a possible biomarker and/or therapeutic target for patients with invasive NRAS-mutated melanoma.

Keywords: melanoma, NRAS, peroxiredoxin, metastasis, phenotype switching.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa de novos casos de câncer por tipo e sexo, Estados Unidos, 2023. Exceto o câncer de pele não melanoma .....	19
Figura 2. Progressão dos tumores de melanoma associado ao seu perfil histopatológico, genético e oxidativo .....	22
Figura 3. Esquema das principais vias de sinalização celular e frequência das mutações no melanoma .....	24
Figura 4. Esquema cronológico das aprovações de tratamento pela US Food and Drug Administration para pacientes com melanomas avançados (individual e combinada).....	26
Figura 5. Estados fenotípicos das células de melanoma .....	30
Figura 6. Modelo de reostato revisado incorporando os seis diferentes estados fenotípicos encontrados no melanoma .....	31
Figura 7. Sinalização de WNT no melanoma.....	32
Figura 8. Hallmarks do câncer relacionados com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34
Figura 9. Funções promotoras e supressoras do câncer relacionadas com os níveis de ROS ..	35
Figura 10. Ciclo catalítico das isoformas de peroxirredoxina (PRDX) .....	37
Figura 11. Atividade das peroxiredoxinas .....	37
Figura 12. Expressão gênica de PRDX2 no nevo à melanoma metastático .....	39
Figura 13. Expressão de PRDX2 nos diferentes tipos de tumores .....	40
Figura 14. Mecanismo envolvido na expressão de PRDX2 em junções aderentes pelo complexo E-caderina/ $\beta$ -catenina.....	40
Figura 15. Modelo esquemático da atividade da gliotoxina em reduzir H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> dependente de tioredoxina.....	42
Figura 16. Resultado das certificações por STR das linhagens de melanoma com mutação em NRAS, utilizadas neste trabalho .....	46
Figura 17. Expressão proteica de PRDX2 em linhagens celulares de melanoma .....	55
Figura 18. Expressão proteica de PRDX1 e PRDX2 em linhagens de melanoma NRAS mutante .....	55
Figura 19. Fotomicrografia das linhagens celulares com mutação em NRAS .....	56
Figura 20. Característica das colônias formadas pelas linhagens de melanoma NRAS mutantes .....	57
Figura 21. Curva de crescimento das linhagens de melanoma NRAS mutante com tempos de proliferação diferentes.....	57
Figura 22. Expressão da proteína ERK fosforilada em linhagens de melanoma NRAS mutante .....	58
Figura 23. Ensaio de migração das linhagens de melanoma NRAS mutante .....	58
Figura 24. Ensaio de invasão celular comparando as linhagens de melanoma NRAS mutante .....	59
Figura 25. Expressão proteica de MITF, AXL e SOX10 em linhagens de melanoma NRAS mutante .....	59
Figura 26. Expressão proteica de E-caderina em linhagens de melanoma NRAS mutante .....	60
Figura 27. Imuno-histoquímica de e-caderina em peles humanas reconstruídas com melanoma NRAS mutante.....	61
Figura 28. Expressão proteica de $\beta$ -catenina em linhagens de melanoma NRAS mutante .....	62
Figura 29. Expressão proteica de N-caderina em linhagens de melanoma NRAS mutante .....	62
Figura 30. Dosagem de citocinas IL-6 e IL-8 em linhagens de melanoma NRAS mutante .....	63
Figura 31. Expressão de genes antioxidantes correlacionados com as linhagens NRAS .....	63
Figura 32. Avaliação cinética da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem de melanoma NRAS mutante após 3 horas .....	64
Figura 33. Teste de viabilidade nas linhagens de melanoma NRAS mutante, fibroblastos (FP)	

e melanócitos (MP).....	65
Figura 34. Teste de sensibilidade a gliotoxina nas linhagens de melanoma NRAS mutante e fibroblastos (FP) quanto a formação de colônias comparada com o controle não tratado, utilizando a concentração do IC <sub>25</sub> e IC <sub>12,5</sub> .....	66
Figura 35. Ensaio de migração celular em linhagens de melanoma NRAS mutante tratadas com gliotoxina e não tratadas.....	66
Figura 36. Expressão proteica de PRDX1, 2, 3 e 4 em linhagens de melanoma NRAS mutante e linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2 .....	68
Figura 37. Expressão proteica e gênica de PRDX2 das linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2 .....	69
Figura 38. Fotomicrografia das linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2 .....	69
Figura 39. Característica das colônias formadas pelas linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2.....	70
Figura 40. Curva de crescimento das linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2 com os tempos de proliferação.....	70
Figura 41. Expressão da proteína ERK fosforilada em linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2 .....	71
Figura 42. Ensaio de migração celular na linhagem de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2 .....	72
Figura 43. Ensaio de invasão celular comparando as linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2.....	72
Figura 44. Expressão proteica de MITF, AXL e SOX10 em linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2 .....	73
Figura 45. Expressão proteica de $\beta$ -catenina em linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2.....	74
Figura 46. Expressão proteica de Snail em linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2 .....	74
Figura 47. Avaliação cinética da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2 .....	75
Figura 48. Fotomicrografia das peles humanas reconstruídas com melanoma NRAS mutante .....	76
Figura 49. Fotomicrografia das peles humanas reconstruídas com melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2.....	76
Figura 50. Expressão de genes normalizado com as linhagens de melanoma NRAS mutante e linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2 .....	78
Figura 51. Correlação de Pearson da expressão de todos os genes testados por RT-PCR.....	78
Figura 52. Correlação da expressão gênica de PRDX2 com genes pró-tumorais em coorte de melanomas primários com mutação em NRAS.....	79
Figura 53. Correlação da expressão gênica de PRDX2 com genes pró-tumorais em coorte de melanomas primários .....	79
Figura 54. Expressão de PRDX2 em tumores de melanoma primários com diferentes tipos de mutações.....	80
Figura 55. Correlação da expressão de PRDX2 com a espessura de Breslow de melanomas primários.....	81
Figura 56. Correlação da expressão de PRDX2 com o estadiamento do tumor primário (AJCC) .....	82
Figura 57. Curva de sobrevida da coorte de pacientes com melanomas primários correlacionados com a expressão de PRDX2.....	82
Figura 58. Curva de sobrevida de pacientes com melanomas NRAS mutantes pela expressão	

de PRDX2..... 83

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Região da mutação em melanoma NRAS mutante.....	45
Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados, utilizados no ensaio de Western Blotting .....	48
Tabela 3. Iniciadores (Primers) utilizados no ensaio de RT-PCR.....	49
Tabela 4. Sequências de shRNA para inibição de PRDX2 .....	51

**LISTA DE ANEXOS****ANEXO A. Resumo ilustrado****ANEXO B. Currículo Lattes****ANEXO C. Ficha do Aluno**

**LISTA DE SIGLAS**

2D: bidimensional

3D: tridimensional

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

AKT: AKT Serina/Treonina Quinase

ARAF: A-Raf Proto-Oncogene, Serina/Treonina Quinase

AXL: Receptor AXL Tirosina Quinase

BRAF: B-Raf Proto-Oncogene, Serina/Treonina Quinase

BSA: albumina de soro bovino

CAT: Catalase

CDH1: E-caderina

CDK4: quinase dependente de ciclina 4

CDKN2A: inibidor de quinase dependente de ciclina 2A

CN: controle negativo

CNNB1:  $\beta$ -catenina

CPSH: cisteína peroxidásica

CPSOH: ácido sulfênico

CRSH: cisteína de resolução

CSNK1A1: Caseína Quinase 1 Alfa 1

Ct: ciclo threshold

CTLA4: Proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4

DCT: Dopacromo Tautomerase

DHR: diidrorodamina 123

DMEM: Meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

E-CAD: E-caderina

ERK1/2: Quinase extracelular reguladas por sinais

ETM: Transição epitélio-mesênquima

FDA: *U.S. Food and Drug Administration*

FN1: Fibronectina 1

FRZD1-7: Receptores Frizzled

GAPDH: Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

GLRX: Glutaredoxina

GNA11: proteína G da subunidade alfa 11

GNAQ: proteína G da subunidade alfa Q  
GPX1: Glutathione peroxidase 1  
GSK3 $\beta$ : Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta  
GSR: Glutathione-Dissulfeto Redutase  
GSTP1: Glutathione S-Transferase Pi 1  
GSTT1: Glutathione S-Transferase Teta 1  
GT: Gliotoxina  
GTP: Trifosfato de guanosina  
H&E: hematoxilina-eosina  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio  
HO<sub>2</sub>: Hidroperoxila  
HRAS: Homólogo Oncogênico Viral do Sarcoma de Rato Harvey  
IC50: Concentração inibitória de 50%  
IL-6 E IL-8: interleucinas  
KISS-1: Supressor de Metástase KiSS-1  
KIT: KIT Proto-Oncogene, Receptor Tirosina Quinase  
KRAS: Homólogo Oncogênico Viral do Sarcoma de Rato Kirsten  
KRT18: Queratina 18  
LEF1: Fator de Ligação Intensificador Linfóide 1  
LRP5 e 6: Proteína Relacionada ao Receptor de LDL  
MAP2K1: Proteína quinase quinase 1 ativada por mitógeno  
MAP2K2: Proteína quinase quinase 2 ativada por mitógeno  
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno  
MART-1: Melan-A  
MEK: proteína quinase que fosforila MAPK  
MITF: fator de transcrição associado à microftalmia  
mTOR: Alvo Mecanístico da Rapamicina Quinase  
NCSC: estado de células-tronco da crista neural  
NF1: neurofibromatose tipo 1  
NF $\kappa$ B: Fator Nuclear Kappa B  
NOS2: Óxido Nítrico Sintase 2  
NOX1, 2, 4: NADPH Oxidase 1, 2 e 4  
NRAS: Homólogo de oncogene viral RAS de neuroblastoma  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Superóxido



O<sub>2</sub>:oxigênio singlete

OH: Hidroxila

PBSA: Solução salina tamponada com fosfato

PD1: Proteína de morte celular programada 1

PHR: Pele humana reconstruída

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase

PKC: Proteína quinase C

PRDX: Peroxirredoxina

PTEN: Fosfatase homóloga à tensina

PTEN: Homólogo de Fosfatase e Tensina

PXDN: Peroxidasin

RAC1: Rac família pequena GTPase 1

RAF1: Raf-1 Proto-Oncogene, Serina/Treonina Quinase

RAS: Proto-Oncogene, GTPase- subfamília RAS (N-RAS, H-RAS e K-RAS)

RNS: Espécies reativas de nitrogênio

ROS: Espécies reativas de oxigênio

ROS1: ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tirosina Quinase

RTK: Receptor de tirosina quinases

SFB: Soro fetal bovino

shRNA: *Short-hairpin RNA*

SMAD2: Membro da Família SMAD 2

SMAD3: Membro da Família SMAD 3

SNAI1: Repressores transcricionais da família Snail 1

SNAI2: Repressores transcricionais da família Snail 2

SOD: Superóxido Dismutase

SOX10: SRY-Box Fator de Transcrição 10

Src: Proto-oncogene tirosina-proteína quinase Src

Srx: Sulfiredoxina

STAT3: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

STR: short tandem repeats markers

TERT: transcriptase reversa da telomerase

TP53: Proteína Tumoral P53

TXN: Tiorredoxina

TYR: Tirosinase

UV: Radiação ultravioleta

VEGFR: Receptor do fator de crescimento endotelial vascular

WB: *Western blotting*

WT: *Wide-type* (tipo selvagem)

ZEB2: *Zinc finger E-box binding homeobox 2*

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	19
EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO MELANOMA .....	19
PROGRESSÃO DO MELANOMA .....	21
MUTAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO MELANOMA .....	23
TERAPIAS APROVADAS PELA FDA PARA MELANOMAS CUTÂNEOS.....	26
ESTADOS FENOTÍPICOS DAS CÉLULAS DE MELANOMA .....	28
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) .....	33
PEROXIRREDOXINAS.....	35
MODULADORES DA ATIVIDADE DE PRDX.....	41
BIOMARCADORES PARA PROGNÓSTICO DO MELANOMA .....	43
OBJETIVOS.....	43
Objetivo geral .....	43
Objetivos específicos .....	44
MATERIAL E MÉTODOS .....	44
Cultura celular e manutenção .....	44
Boas práticas de cultura de células: PCR para a detecção de <i>Mycoplasma sp.</i> .....	45
Certificação das linhagens celulares de melanoma.....	46
Ensaio de viabilidade celular – Curva de morte .....	46
Curva de crescimento – Ensaio de Exclusão do Azul de Tripán .....	47
Avaliação da expressão proteica por Western Blotting .....	47
Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real .....	48
Ensaio Clonogênico .....	49
Ensaio para avaliação do potencial dos tratamentos na invasão celular .....	49
Ensaio para avaliação do potencial dos tratamentos na migração celular .....	50
Ensaio de avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por diidrorodamina 123 (DHR).....	50
Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	50

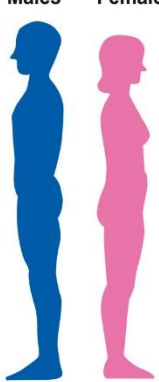
Silenciamento gênico de <i>PRDX2</i> através de vetores lentivírais .....	51
Reconstrução de pele humana contendo melanoma .....	51
Ensaio da Avaliação de histologia e imunohistoquímica em PHR .....	52
Análises estatísticas.....	53
Análises de bioinformática .....	53
RESULTADOS .....	54
Identificação do padrão de <i>PRDX2</i> comparado com perfil fenotípico em linhagens de melanoma com mutação em <i>NRAS</i> .....	54
Tratamento com gliotoxina como mimético de <i>PRDX2</i> .....	64
Inibição do gene <i>PRDX2</i> por <i>shRNA</i> na linhagem de melanoma SKMEL-173 naive e mudança de perfil fenotípico .....	68
Pele humana reconstruída (PHR) com as linhagens celulares <i>NRAS</i> naive e silenciadas por <i>shRNA</i> .....	75
Correlação da <i>PRDX2</i> com marcadores fenotípicos de invasão (assinaturas de genes invasivos) 77	
Análises <i>in silico</i> de <i>PRDX2</i> de uma coorte de pacientes com melanomas primários relacionado com as características clínicas da doença.....	80
DISCUSSÃO .....	84
Ausência de <i>PRDX2</i> altera o perfil fenotípico em melanoma <i>NRAS</i> mutante.....	84
<i>PRDX2</i> modula genes, proteínas e citocinas pró-tumorais em melanoma <i>NRAS</i> mutante.....	85
A modulação farmacológica e genética de <i>PRDX2</i> altera o perfil fenotípico celular .....	86
Correlação de genes pró-tumorais com expressão de <i>PRDX2</i> .....	89
<i>PRDX2</i> está expressa em melanoma de pacientes com melhor prognóstico e maior sobrevida 91	
CONCLUSÃO.....	92
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

## INTRODUÇÃO

### EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO MELANOMA

O câncer de pele é o mais frequente no Brasil, correspondendo a 30% dos tumores malignos registrados. Os tipos de câncer de pele são: carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, representando a maioria dos casos e o câncer de pele melanoma. O melanoma é mais incidente na região sul e representa 3% dos casos de câncer de pele (Ministério da Saúde, 2023). Apesar da baixa porcentagem, estima-se 8.980 novos casos com 1.923 óbitos registradas no Brasil, em 2020 (INCA, 2022). *American Cancer Society* apresenta o câncer de pele melanoma em quinto lugar na estimativa de novos casos em 2023 em ambos os sexos (SIEGEL MPH et al., 2023) (Figura 1). O melanoma é o tipo de câncer de pele mais letal, sendo responsável por 57.043 mortes no mundo todo, cerca de 18% dos 324.635 novos casos em 2020 (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESERCH ON CANCER, 2019). Essa alta letalidade pode ser explicada pela grande capacidade de invasão e metástase de um tumor primário para outros órgãos, por suas propriedades intrínsecas e extrínsecas (microambiente tumoral) (SATYAMOORTHY; HERLYN, 2002).

Figura 1. Estimativa de novos casos de câncer por tipo e sexo, Estados Unidos, 2023. Exceto o câncer de pele não melanoma

Estimated New Cases						
			Males	Females		
Prostate	288,300	29%		Breast	297,790	31%
Lung & bronchus	117,550	12%		Lung & bronchus	120,790	13%
Colon & rectum	81,860	8%		Colon & rectum	71,160	8%
Urinary bladder	62,420	6%		Uterine corpus	66,200	7%
Melanoma of the skin	58,120	6%		Melanoma of the skin	39,490	4%
Kidney & renal pelvis	52,360	5%		Non-Hodgkin lymphoma	35,670	4%
Non-Hodgkin lymphoma	44,880	4%		Thyroid	31,180	3%
Oral cavity & pharynx	39,290	4%		Pancreas	30,920	3%
Leukemia	35,670	4%		Kidney & renal pelvis	29,440	3%
Pancreas	33,130	3%		Leukemia	23,940	3%
<b>All Sites</b>	<b>1,010,310</b>	<b>100%</b>		<b>All Sites</b>	<b>948,000</b>	<b>100%</b>

Fonte: SIEGEL MPH et al., 2023.

O desenvolvimento do melanoma é multifatorial, relacionado com a susceptibilidade genética e exposição ambiental. O principal fator ambiental é a exposição à radiação ultravioleta (UV) responsável por 60-70% dos casos de melanomas. A radiação solar UV é dividida em UVA, UVB e UVC (sendo esta última absorvida pela camada de ozônio). A radiação UVB pode

gerar danos no DNA (ácido desoxirribonucleico) que induzem a apoptose celular. Por sua vez, a radiação UVA pode gerar moléculas de oxigênio altamente reativas, como oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio, que reagem causando danos no DNA (D’ORAZIO et al., 2013). A exposição natural à luz solar é considerada um fator de risco para o câncer de pele (DZWIERZYNSKI, 2021). Além disso, as câmaras de bronzeamento são reconhecidas como pertencentes à categoria de risco para o câncer de pele. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) proibiu o uso de câmaras de bronzeamento em 2009, baseando-se em estudos que evidenciaram uma relação direta entre o uso dessas câmaras e o aumento do risco de câncer de pele (IARC, 2006).

A pigmentação derivada da produção abundante de melanina, protege o folato e permite a penetração de UV para síntese de vitamina D. Indivíduos com pele clara ou escura têm geralmente o mesmo número de melanócitos, porém na pele clara, os melanócitos produzem menos melanina. Portanto, os indivíduos com fototipo I (pele clara, cabelos loiros ou ruivos, olhos claros e sardas) têm maior risco de desenvolver melanoma, já que indivíduos caucasianos correspondem a 70% dos casos de melanoma. Além disso, os homens têm 1,5 vezes mais chances de desenvolver melanoma do que as mulheres. A predisposição hereditária representa 5-10% dos casos de melanoma. O desenvolvimento do melanoma está relacionado à presença de nevos, fatores genéticos, dieta, imunossupressão e histórico de câncer (CARR; SMITH; WERNBERG, 2020; DZWIERZYNSKI, 2021).

Na clínica médica, o sistema de Breslow é utilizado para ajudar na avaliação do estágio do câncer de pele melanoma. Esse método mede a profundidade do tumor de melanoma na pele, desde o topo até as células tumorais mais profundas. Caso o tumor esteja ulcerado, a medida é feita a partir da base da úlcera até as células mais profundas. Tumores com maior espessura ou profundidade estão associados a taxas mais baixas de sobrevivência (EL SHAROUNI et al., 2022).

Há também o sistema *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) de estadiamento, que fornece informações sobre a quantidade e disseminação do câncer no corpo do paciente. O sistema de estadiamento do melanoma são divididos em quatro estágios: I e II para melanomas primários, estágio III para pacientes com metástases locoregionais e estágio IV para pacientes com metástases em locais distantes, baseado também na espessura do tumor (SCOLYER et al., 2020). Criado e continuamente atualizado pelo AJCC, é uma ferramenta importante para avaliar a extensão do câncer e determinar o tratamento mais adequado para o paciente (BALCH et al., 2009).

## PROGRESSÃO DO MELANOMA

Os melanócitos são células derivadas da crista-neural que residem na pele, olhos, folículos capilares e diversos tecidos do corpo. Representam a minoria da população de células da epiderme basilar e têm como principal função o fornecimento do pigmento da melanina. A melanina é uma macromolécula complexa que absorve UV, atua na proteção dos queratinócitos da epiderme, evitando danos ao DNA induzidos pela UV. A diminuição de pigmento reduz a proteção à UV, o que contribui diretamente na carcinogênese (DAMSKY; BOSENBERG, 2017).

A proliferação benigna dos melanócitos formam os nevos melanocíticos, que geralmente crescem na primeira e segunda década de vida com a tendência de regredir após a sexta década. A alta prevalência de nevos comuns contribuem para o aparecimento de melanomas, embora a evolução de um nevo para melanoma seja rara (DAMSKY; BOSENBERG, 2017; SHAIN; BASTIAN, 2016). O nevo displásico seria uma etapa intermediária entre o nevo comum e o melanoma, potencialmente maligno (com lesões malignas e benignas), quando os melanócitos adquirem mutações ativadoras de proliferação. O melanoma *in situ* refere-se à proliferação de melanócitos com núcleos aumentados que crescem de forma irregular na epiderme, pode estar relacionado ou não com lesões invasivas (podem persistir por anos antes de se tornar invasiva). Nesse tipo de melanoma a taxa de sobrevida é de 100% pela ressecção do tumor e ocorre geralmente em indivíduos mais velhos, ou que tiveram exposição solar crônica com alta frequência de mutações que afetam as vias de sinalização de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Quando as células deixam o epitélio da epiderme e se inserem no tecido mesenquimal subjacente (derme), o melanoma se torna invasivo. Quanto maior a profundidade da invasão do melanoma, maior o risco de doença metastática. O melanoma metastático é caracterizado pela disseminação dessas células de um sítio primário para colonizar outros tecidos, sendo que os linfonodos podem ser acometidos (SHAIN; BASTIAN, 2016). A progressão do melanoma está associada a diminuição de diferenciação e também de marcadores de melanoma como MITF (fator de transcrição associado a microftalmia), além de alteração em marcadores de adesão celular, como perda de E-caderina, aumento de N-caderina, integrina e metaloproteinases (MILLER; MIHM, 2006).

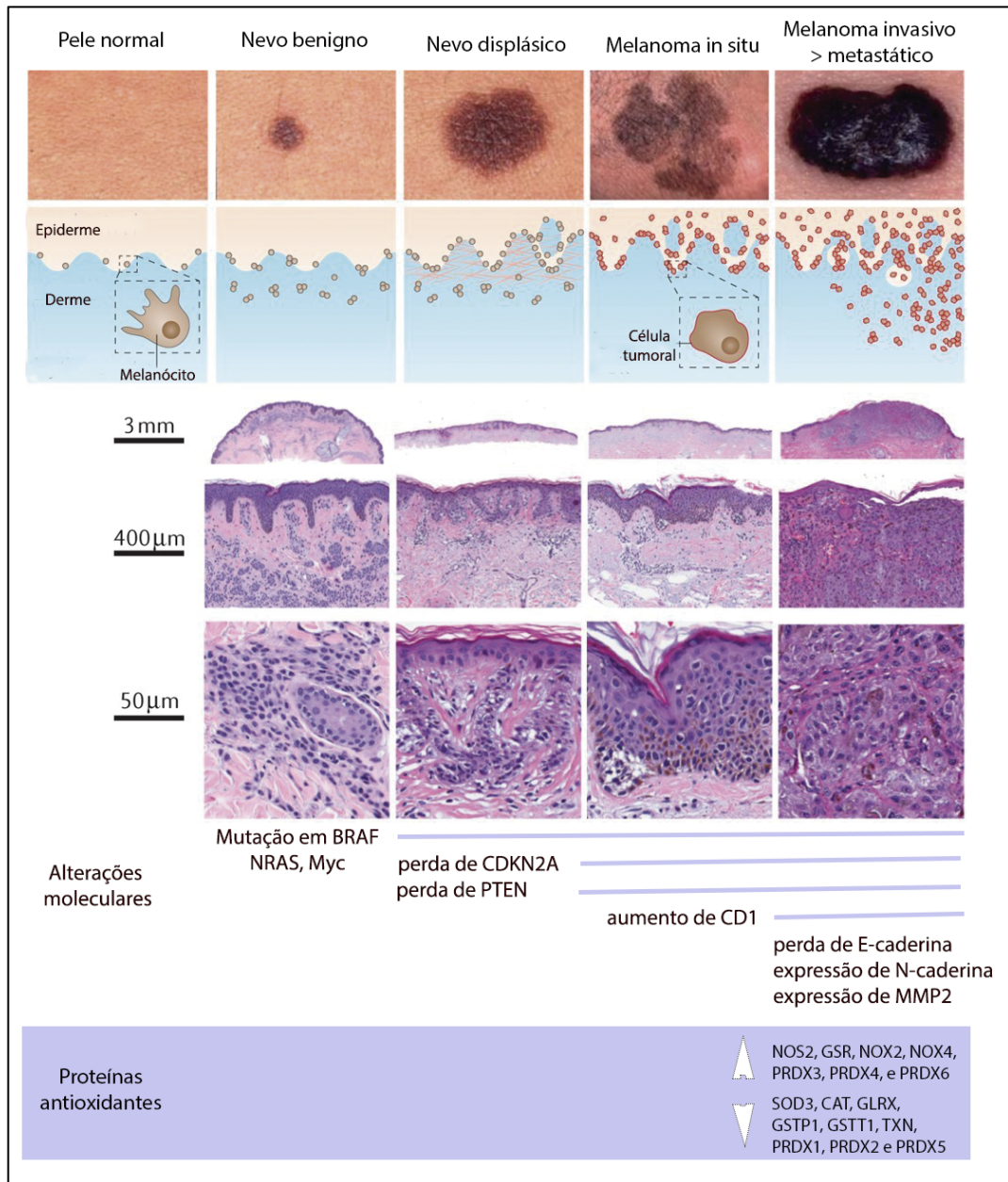
As células cancerígenas possuem uma notável habilidade de se adaptar a condições de estresse, incluindo a capacidade de utilizar sistemas antioxidantes para garantir sua sobrevivência. Em um estudo de bioinformática realizado por Carvalho e colaboradores

(CARVALHO et al., 2022), foram identificadas proteínas alteradas em pacientes com melanoma invasivo e metastático. Entre elas, as proteínas NOS2 (Óxido Nítrico Sintase 2), SOD1 (Superóxido Dismutase 1), GPX1 (Glutationa Peroxidase 1), NOX2 (NADPH Oxidase 2), NOX4 (NADPH Oxidase 4), PRDX1 (Peroxiredoxina 1), PRDX4 (Peroxiredoxina 4), PRDX5 (Peroxiredoxina 5) e PXDN (Peroxidasina) foram encontradas em níveis elevados no melanoma invasivo, enquanto as proteínas SOD3 (Superóxido Dismutase 3), CAT (Catalase), GSTT1 (Glutationa S-Transferase Teta 1), NOX1 (NADPH Oxidase 1), PRDX2 (Peroxiredoxina 2) e PRDX6 (Peroxiredoxina 6) apresentaram-se diminuídas. Já no melanoma metastático, houve um aumento nas concentrações de NOS2, GSR (Glutationa-Dissulfeto Redutase), NOX2, NOX4, PRDX3 (Peroxiredoxina 3), PRDX4 e PRDX6, enquanto as proteínas SOD3, CAT, GLRX (Glutarredoxina), GSTP1 (Glutationa S-Transferase Pi 1), GSTT1, TXN (Tiorredoxina), PRDX1, PRDX2 e PRDX5 foram encontradas em níveis reduzidos. Esses resultados destacam a importância das diferentes isoformas de proteínas redox em diferentes estágios do tumor, como evidenciado na Figura 2.

Figura 2. Progressão dos tumores de melanoma associado ao seu perfil histopatológico,



## genético e oxidativo



Fonte: Adaptado de CARVALHO *et al.*, 2022; MILLER; MIHM, 2006; SHAIN; BASTIAN, 2016.

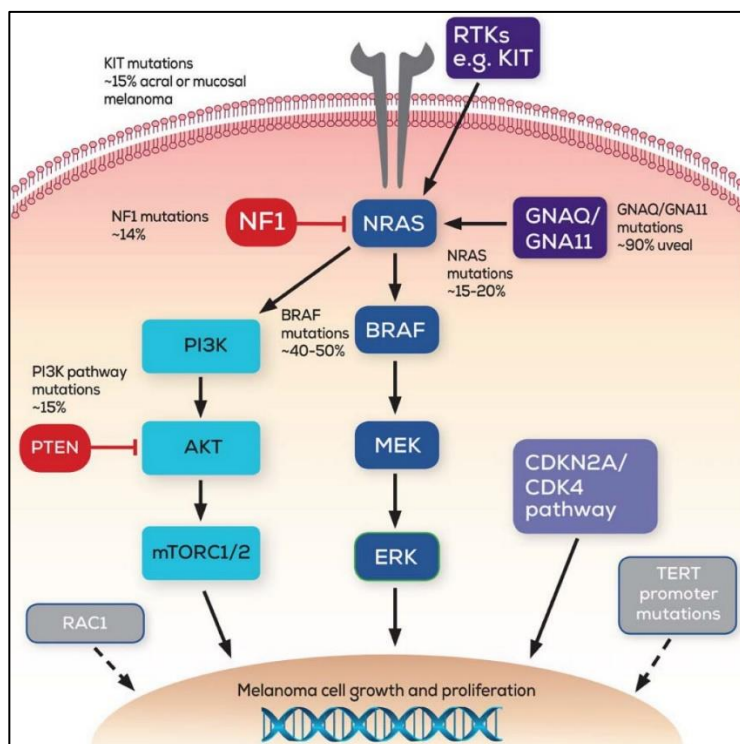
## MUTAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO MELANOMA

Melanomas são caracterizados por um acúmulo de diversas mutações patogênicas, sendo as mais frequentes, as que alteram vias importantes de sinalização de sobrevivência celular, incluindo proliferação, metabolismo, resistência à apoptose, controle do ciclo e replicação (SHAIN; BASTIAN, 2016). No caso do melanoma, a principal via afetada é a via de MAPK, que está envolvida em diversos processos fisiológicos, tais como proliferação, diferenciação,

desenvolvimento, migração, apoptose e transformação celular (TEIXIDO et al., 2021).

A via RAS regula várias vias de ativação através da cascata de fosforilação, a qual recruta fatores de transcrição para ativar conjuntos de genes-alvo. A ligação ao receptor de tirosina quinase (RTK) na superfície extracelular, estimula a ativação de RAS na face interna da membrana plasmática, e assim propaga o sinal para proteína serina-treonina quinase (RAF) (WARNE; VICIAN; DOWNWARD, 1993), que possui três homólogos: A-Raf Proto-Oncogene, Serina/Treonina Quinase (ARAF), B-Raf Proto-Oncogene, Serina/Treonina Quinase (BRAF) e Raf-1 Proto-Oncogene, Serina/Treonina Quinase (CRAF (chamado de RAF1)). Na presença do fator de crescimento, RAS ligado ao Trifosfato de guanosina (GTP) ativa RAF, que fosforila dois membros da família da proteína quinase quinase ativada por mitógeno chamado MEK1 e MEK2 (conhecido como MAP2K1 e MAP2K2) que por sua vez, fosforilam e ativam a cascata de quinases relacionadas ao sinal extracelular chamado ERK1 e ERK2 (conhecido como MAPK3 e MAPK1) (Figura 3), que regulam amplos processos biológicos como a progressão do ciclo celular. A desregulação dessa via causa hiperativação da cascata, com subsequente aumento de proliferação, sobrevivência, invasão, metástases e angiogênese (AL MAHI; ABLAIN, 2022; TEIXIDO et al., 2021).

Figura 3. Esquema das principais vias de sinalização celular e frequência das mutações no melanoma



Fonte: DAVIS et al., 2018.

Outro efeito de RAS é pela via de fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) (SJOLANDER et al., 1991), que é uma família de quinases lipídicas que regulam várias proteínas sinalizadoras como as proteínas quinases serina-treonina (AKT). A proteína AKT é responsável pela degradação de TP53, inibição de proteínas pró-apoptóticas, e ativação à proteína alvo da Rapamicina (mTOR), um regulador de crescimento. A fosforilação de PI3K é reprimida pelo homólogo de fosfatase e tensina (PTEN), um importante supressor de melanoma (LEONARDI et al., 2018; LI et al., 1997). As vias MAPK, PI3K e Fator Nuclear Kappa B (NFκB) se cruzam significativamente na patogênese do melanoma.

Um importante alvo da via MAPK no contexto do melanoma é o MITF, um regulador mestre na diferenciação e manutenção dos melanócitos (ARAZARENA; WELLBROCK, 2019a), que modula a pigmentação e tem atividade transcricional moduladas por ERK, por meio de modificações pós-transcricionais como a fosforilação. O MITF pode agir como oncogene no melanoma, pois amplifica e promove a proliferação dessas células tumorais (TEIXIDO et al., 2021). O KIT é um proto-oncogene receptor tirosina quinase que se encontra majoritariamente na membrana celular de melanomas acrais e mucosos, sendo biologicamente diferente dos cutâneos (CURTIN et al., 2005; DAVIS et al., 2018). O gene de neurofibromatose tipo 1 (NF1) é uma proteína ativadora de GTPase que amortece a sinalização de MAPK regulando negativamente a atividade de RAS, desse modo, mutações com perda de NF1 levam à ativação de MAPK e aumento das vias de proliferação.

Alterações nos genes BRAF, NRAS, NF1 e KIT estão presentes em 93% dos melanomas cutâneos e são mutuamente exclusivos, embora uma pequena porção dos tumores apresente alterações em vários genes (AKBANI et al., 2015; AL MAHI; ABLAIN, 2022; LEONARDI et al., 2018). A prevalência das mutações é de aproximadamente 40-60% para a mutação BRAF, sendo a mais comum, seguida de 15-30% para NRAS, 10-25% para NF1 e 6-10% para triplo selvagem (WT) e KIT (AKBANI et al., 2015). As mutações nos outros genes RAS como homólogo oncogênico viral do sarcoma de rato kirsten (KRAS) e homólogo oncogênico viral do sarcoma de rato harvey (HRAS) são muito mais raras, ocorrendo em 3% e 2% dos melanomas cutâneos, respectivamente.

Já as mutações nas proteínas G (GNAQ/GNA11) ocorrem em quase 90% dos melanomas uveais, mas são extremamente raras em tumores cutâneos (DAVIS et al., 2018). A presença de mutações BRAF e NRAS em nevos benignos suportam a hipótese de que a ativação das vias de MAPK é um evento precoce no desenvolvimento do melanoma (SHAIN; BASTIAN, 2016). No entanto, o melanoma só se inicia quando combinado com inativação de gene supressores de tumor como inibidor de quinase dependente de ciclina 2 (CDKN2A), PTEN ou proteína tumoral

p53 (TP53) (AL MAHI; ABLAIN, 2022; PATTON et al., 2005), além de ser determinante para a ocorrência de metástase (LEE et al., 2013).

A mutação em BRAFV600E é a mais frequente no melanoma cutâneo, associado ao subtipo com disseminação superficial, em paciente mais jovens, e áreas da pele não expostas ao sol, afetando cerca de 80% dos melanomas. V600K envolve 15% e V600R/M/D/G são encontradas em cerca de 5% dos casos (CASTILLO et al., 2020; TEIXIDO et al., 2021).

Oitenta por cento das mutações NRAS ocorrem no códon 61 e compreendem substituições de aminoácidos na posição 61 de glutamina (Q) para arginina (R - 38%), lisina (K - 34%), leucina (L - 10%) e menos frequente o glutamato (E), histidina (H) ou prolina (P) (WEBSTER; KUGEL; WEERARATNA, 2015), que resulta em uma ativação constitutiva da atividade de RAS. A mutação em NRAS surgem em pele com dano solar acumulativo, sugere-se uma mutagênese relacionada a UV, e está relacionada com os piores prognósticos em paciente com melanoma (TEIXIDO et al., 2021).

## TERAPIAS APROVADAS PELA FDA PARA MELANOMAS CUTÂNEOS

Nos últimos 10 anos, houve um grande avanço no prognóstico do melanoma, com a aprovação de 13 novas terapias pela FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), incluindo terapias direcionadas e imunológicas (LUKE et al., 2017), com inibidores de *checkpoint* imunológico (ipilimumabe) isolados ou combinados, utilizados como terapia adjuvante (PATTON et al., 2021) (Figura 4).

Figura 4. Esquema cronológico das aprovações de tratamento pela US Food and Drug Administration para pacientes com melanomas avançados (individual e combinada)

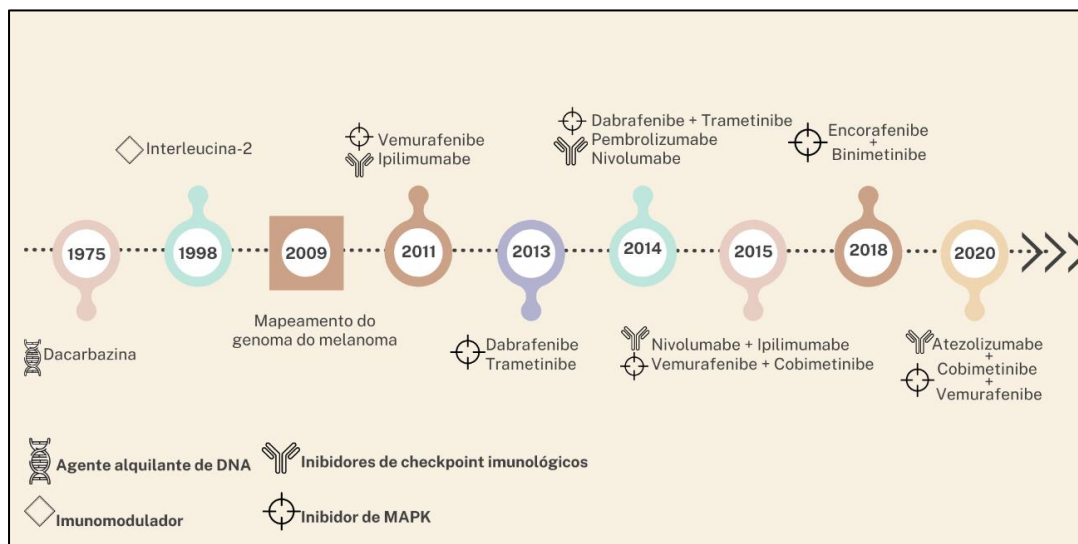


Figura adaptada: PATTON *et al.*, 2021.

O tratamento do melanoma metastático mostrou mudanças ao longo dos anos com o desenvolvimento de inibidores de quinases (MAPK), como os inibidores de BRAF (vemurafenibe, dabrafenibe, ou encorafenibe) que obteve uma resposta terapêutica em 50-80% de pacientes, com sobrevida global de 16 a 20 meses. Porém, as vias de MAPK são reativadas por meio de vias alternativas, resultando em proliferação e crescimento de metástases que estavam em remissão, devido a uma resistência secundária à monoterapia após 5-6 meses. Por isso, buscou-se a combinação de terapias utilizando inibidores de BRAF com inibidores de MEK para uma melhora de resposta e sobrevida (COSGAREA *et al.*, 2017).

Embora as terapias alvo dirigidas e imunoterapias ampliaram o número de pacientes que podem se beneficiar desses avanços terapêuticos (EGGERMONT *et al.*, 2018; LONG *et al.*, 2017). A maioria dos pacientes com melanoma metastático ainda não é tratado pelas terapias atuais, devido à heterogeneidade genética da doença, especialmente em pacientes cujos tumores não possuem mutação BRAF e em subtipos raros de melanoma, como uveal, acral e mucosa. Além disso, muitos melanomas são inerentemente resistentes a essas terapias (resistência primária), ou desenvolvem resistência após uma resposta inicial (resistência adquirida) (PATTON *et al.*, 2021).

Os pacientes que apresentam mutações em RAS, presentes em cerca de 30% dos melanomas, principalmente no gene NRAS, ainda têm poucas opções de tratamento eficazes. Isto é especialmente crítico após a falha da imunoterapia com anticorpos anti-CTLA4 (proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4) ou anti-PD1 (proteína de morte celular programada 1). Até agora, apenas inibidores de MEK têm se mostrado eficientes em ensaios clínicos para este grupo de pacientes. Binimetinibe, um inibidor de MEK, demonstrou atividade clínica em um estudo aberto de fase II com uma taxa de resposta parcial de 20% (SINGH; LONGO; CHABNER, 2015).

Outro estudo em pacientes com melanoma NRAS mutante que utilizaram binimetinibe, apresentou uma taxa de resposta maior, mas houve pouca diferença no tempo de sobrevida (11 vs. 10,1 meses,  $p = 0,5$ ) (DAVIS *et al.*, 2018; MUÑOZ-COUSELO *et al.*, 2017; TSAO *et al.*, 2012). Pacientes com melanoma metastático com mutação em NRAS apresentaram um aumento na sobrevida de 2,8 meses com binimetinibe, em comparação com dacarbazina (1,5 meses), mas ainda com uma sobrevida mais baixa do que pacientes com mutação em BRAF (COSGAREA *et al.*, 2017). No entanto, pacientes que já foram submetidos a tratamento com imunoterapia mostraram uma melhor resposta com inibidores de MEK, com uma taxa de

sobrevida de 5,5 meses (RANDIC et al., 2021). Portanto, opções de tratamento eficazes são urgentemente necessárias para pacientes com melanoma avançado com mutação NRAS.

Outros inibidores de MEK (trametinibe e selumetinibe) foram avaliados em pacientes com melanoma avançado com mutação NRAS, sem resultados favoráveis (FALCHOOK et al., 2012; KIRKWOOD et al., 2012). Em contraste, outro inibidor de MEK em desenvolvimento clínico, o pimasertibe, em um estudo de fase I mostrou atividade clínica em pacientes com melanoma localmente avançado ou metastático, particularmente em tumores com mutações BRAF e NRAS. A taxa de resposta foi de 12,4% (11/89), e 9 dos 11 que responderam a terapia apresentavam uma mutação BRAF e/ou NRAS (3/11) (LEBBÉ et al., 2021; TEIXIDO et al., 2021).

No Brasil, de acordo com Ministério da Saúde (PORTARIA CONJUNTA N° 19, de 25 de OUTUBRO de 2022), o tratamento é definido após a confirmação histopatológica e o estadiamento do caso. As possibilidades terapêuticas do melanoma cutâneo incluem tratamento cirúrgico, adjuvante, sistêmico e radioterapia (SAÚDE, 2022). A Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) recomenda terapia adjuvante com inibidores de BRAF/MEK para pacientes com mutação em BRAF. Pacientes com doenças em estágios III recomenda o uso de nivolumabe e pembrolizumabe. Pacientes com melanoma em estágio IV ressecável, assim como as diretrizes americanas, recomenda-se o uso de nivolumabe adjuvante, pembrolizumabe ou dabrafenibe em conjunto com trametinibe. Porém, em caso de falha terapêutica não há outro tipo de associação recomendada. ASCO também orienta para paciente com melanoma cutâneo metastático com mutação em BRAF, o uso de ipilimumabe e nivolumabe, seguido de nivolumabe em monoterapia ou pembrolizumabe (SETH et al., 2020).

Embora as terapias para melanoma, bem como imunoterapias, tenham progredido notavelmente, a taxa de resposta ainda é baixa e a maioria dos pacientes adquire resistência após o tratamento. Portanto, as futuras terapias dependerão de outros fatores, como a capacidade de modular eventos de reprogramação não genéticos, como a desdiferenciação (FALLETTA et al., 2017).

## ESTADOS FENOTÍPICOS DAS CÉLULAS DE MELANOMA

A alta plasticidade das células de melanoma ocorre pela alteração entre os estados fenotípicos celulares em resposta ao microambiente para crescimento e sobrevivência do tumor. A metástase e heterogeneidade fenotípica do melanoma são coordenados pelo acúmulo de eventos genéticos irreversíveis (HUANG et al., 2021). A heterogeneidade influencia a resistência à terapia e representa um grande desafio, pois cada paciente apresenta células

tumorais com mutações, padrões de transcrição e fenótipos, que respondem diferentemente a terapia (PATTON et al., 2021), havendo heterogeneidade das células de melanoma entre pacientes, entre lesões em um mesmo indivíduo e dentro de um mesmo tumor (ATKINS et al., 2021).

As células podem permanecer quiescentes por muitos anos até iniciar um novo tumor (metástase) ou ocorrer a recidiva do tumor após uma terapia aparentemente bem-sucedida (SOSA; BRAGADO; AGUIRRE-GHISO, 2014). Diferente das células com fisiologia normal, onde as células-tronco têm uma via unidirecional de diferenciação, as células tumorais transitam em diferentes estados fenotípicos de forma dinâmica. Apesar da possibilidade da troca fenotípica ocorrer em resposta à estímulos externos, foi proposto que as lesões genéticas associadas ao câncer aumentam as chances de troca fenotípica, conhecido como instabilidade fenotípica (HOEK; GODING, 2010). Ou seja, as mutações podem promover a progressão do câncer, aumentando as chances da transição ocorrer (RAMBOW; MARINE; GODING, 2019a).

O melanoma possui plasticidade fenotípica (*phenotype switching*) em resposta às condições de estresse e ligadas a resistência à terapia. O sistema clássico classifica dois estados: 1. células de melanoma proliferativas em condições de baixo estresse e que exibem uma diferenciação fenotípica, com alta expressão de MITF (*hallmark* de fenótipo proliferativo das células de melanoma), e 2. O estado invasivo, que está associado com as vias de sinalização adaptadas às altas condições de estresse (HUANG et al., 2021). A indução de uma mudança fenotípica exigiria um sinal que alterasse a atividade dos componentes de “*feedback*” positivo, como converter um repressor transcricional em ativador ou reverter modificações epigenéticas responsáveis por estabilizar um fenótipo específico (RAMBOW; MARINE; GODING, 2019a; WOUTERS et al., 2019).

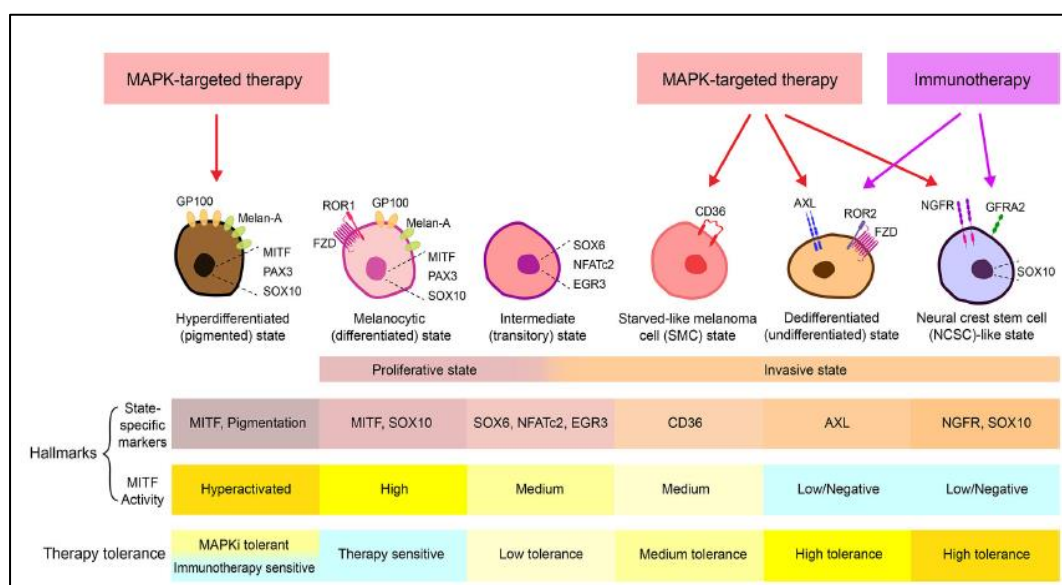
O termo EMT (transição epitélio-mesênquima) é inapropriado para o melanoma, pois os melanócitos não são epiteliais e seu fenótipo invasivo desdiferenciado não é mesenquimal. O termo “*switching*” fenotípico tem sido introduzido para descrever as transições entre estados fenotípicos (RAMBOW; MARINE; GODING, 2019a). Os biomarcadores têm sido utilizados para definir o estado fenotípico celular do melanoma e mecanismos moleculares relacionado com a mudança fenotípica (*switching*) do microambiente, e sua relação com disseminação metastática e resistência à terapia (ATKINS et al., 2021; HUANG et al., 2021).

Alguns marcadores alterados de fenótipo celular incluem: fatores de transcrição SOX10, que regula proliferação celular, crescimento tumoral e invasão e também está relacionado com resposta a terapia alvo dirigida. O gene MITF tem um papel na definição dos estados fenotípicos, pois sua desregulação por oncogenes poderia levar à desdiferenciação (RAMBOW;



MARINE; GODING, 2019a) e está associada a maior proliferação, mas baixo potencial invasivo (BITTNER et al., 2000; SENSI et al., 2011). AXL (AXL Receptor de tirosina-quinase) identificado em linhagens celulares com um domínio catalítico de proteína quinase (QUONG et al., 1994), posteriormente relacionado com um papel na invasão e metástases de células tumorais. Ao longo dos anos, os estados fenotípicos foram definidos de acordo com a expressão de assinaturas genéticas, diferente sensibilidade terapêutica, e potencial metastático associado com esses marcadores. Os estados transcricionais podem ser caracterizados pela expressão de AXL ou MITF, já descritos como classes ‘invasivas’ e ‘proliferativas’, respectivamente, embora esses estados possam coexistir no ambiente intratumoral (ATKINS et al., 2021; HUANG et al., 2021) (Figura 5).

Figura 5. Estados fenotípicos das células de melanoma



Fonte: HUANG *et al.*, 2021.

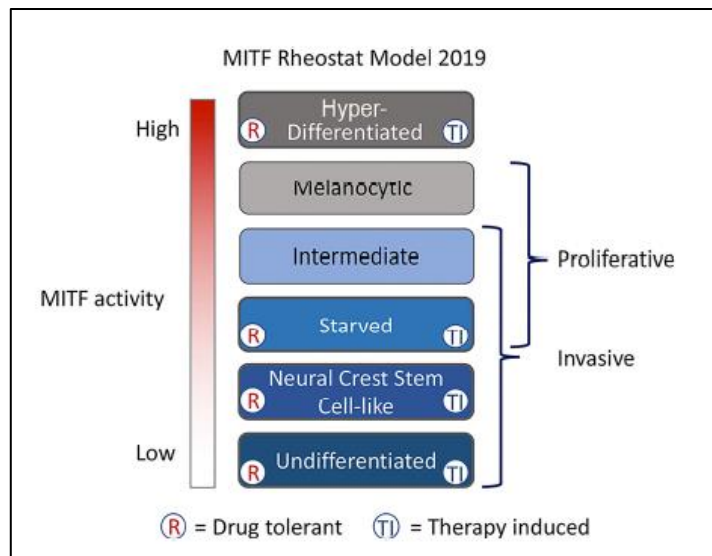
O modelo do reostato explica que baixos níveis de MITF estão associados com parada de ciclo em G1 ou um ciclo mais lento, caracterizado por altos níveis de p27 e capacidade invasiva. Enquanto a expressão de MITF promove a proliferação e suprime a invasão, indica que G1 estaria associada a diferenciação. Para a formação de metástases, as células precisariam a fazer a transição de um estado proliferativo do tumor primário para um estado invasivo com parada em G1 e reentrar no ciclo celular para o crescimento das metástases em sítios secundários (CARREIRA et al., 2006a).

O modelo reostato apresenta seis diferentes estados fenotípicos encontrados no melanoma, classificados de acordo com a atividade de MITF: 1- estado diferenciado com alta atividade de



MITF em células diferenciadas; 2- estado melanocítico com atividade de MITF em células proliferativas; 3- estado intermediário exibindo um perfil de expressão gênica mista com características de invasão e proliferação; 4- estado faminto (*starved*) e/ou estado induzido por terapia (ainda não está claro se esse e o estado intermediário são realmente distintos); 5- estado de células-tronco da crista neural (NCSC) com baixa atividade de MITF, mais invasivas; 6- estado indiferenciado. Os estados diferenciados, “*starved*”, NCSC e indiferenciados são tolerantes à terapia, pois fazem troca fenotípica para promover sobrevivência e resistência à terapia. Os estados desdiferenciados podem surgir se as respostas adaptativas falharem em aliviar o estresse (Figura 6) (RAMBOW et al., 2018). Uma situação de estresse pode levar a uma reprogramação fenotípica, as células adquirem um comportamento invasivo em busca de um microambiente favorável, e caso o estresse não seja resolvido, as células adotam um estado dormente ou indiferenciado para sua sobrevivência (RAMBOW et al., 2018).

Figura 6. Modelo de reostato revisado incorporando os seis diferentes estados fenotípicos encontrados no melanoma



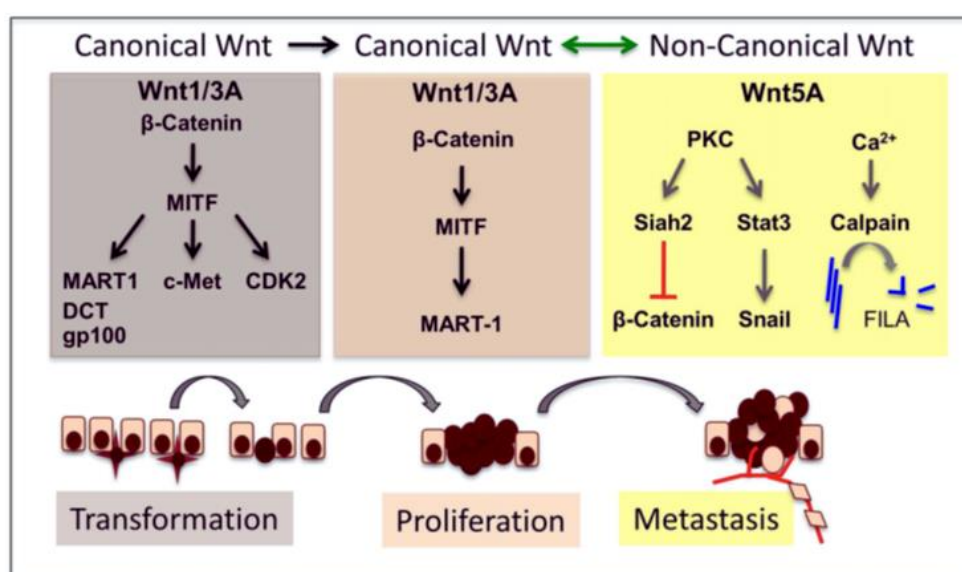
Fonte: RAMBOW *et al.*, 2018.

Os marcadores de fenótipos proliferativos e invasivos após o *switched* fenotípico são semelhantes aos marcadores da EMT, como a sinalização WNT do tipo canônico ou não-canônico. A via não-canônica de WNT (5A) sinaliza negativamente regulando MART-1, e é mediador do *switched* do estado proliferativo para o estado invasivo. Assim como a via canônica de WNT (1/3A) mediada pela  $\beta$ -catenina, um coativador transcricional como componente central. As proteínas WNT1/WNT3A liga-se com receptores Frizzled (FRZD1-7), receptores de lipoproteínas (LRP5 e 6) que estimulam a sinalização intracelular para regular a

estabilidade e transcrição da  $\beta$ -catenina, dessa forma, a atividade de  $\beta$ -catenina contribui para diminuição de metástases no melanoma. A estimulação da sinalização WNT canônica ativa e previne a degradação da  $\beta$ -catenina pela inibição do glicogênio sintase quinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). O bloqueio da degradação da  $\beta$ -catenina leva à sua estabilização no citosol, permitindo sua translocação no núcleo e associação com fatores de transcrição (TEIXIDO et al., 2021). A via canônica coopera com a sinalização de MAPK para regular a atividade de MITF, em células de melanoma proliferativas. A sinalização de LEF1/  $\beta$ -catenina ativa MITF que por sua vez ativa genes-alvo específicos melanocíticos como melan-A (MART-1), DCT e TYR (WEBSTER; KUGEL; WEERARATNA, 2015).

A via não canônica de WNT (5A) é associada com o maior potencial metastático das células de melanoma. WNT5A promove a invasão pela via PKC/Ca<sup>2+</sup> remodelando o citoesqueleto celular e promove motilidade. WNT5A via PKC medeia motilidade das células de melanoma por inibição de repressores metastáticos (KISS-1 e ECAD) e regulação de moléculas associadas a metástase (CD44 e SNAIL). A regulação negativa da via canônica e regulação positiva da via não-canônica são promotores do *switched* fenotípico do estado proliferativo para o estado invasivo. Tumores com altos níveis de WNT5A são intrinsecamente resistentes às terapias alvo dirigidas. Sendo assim, a via WNT não-canônica sugere um tumor mais agressivo com maior potencial de resistência à terapia e metástase (WEBSTER; KUGEL; WEERARATNA, 2015) (Figura 7).

Figura 7. Sinalização de WNT no melanoma



Fonte: WEBSTER; KUGEL; WEERARATNA, 2015.

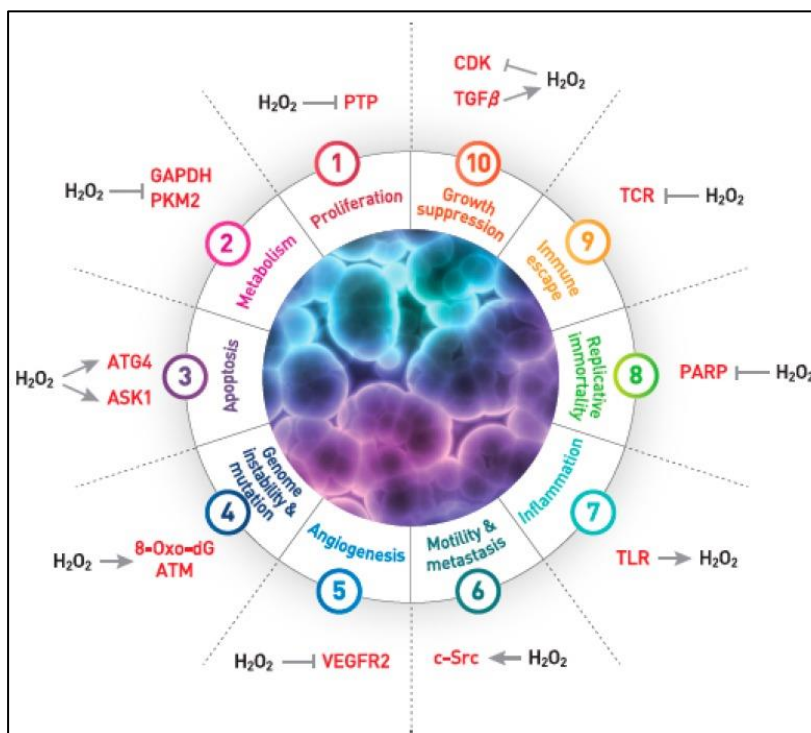
## ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Os radicais livres são espécies moleculares com elétron(s) desemparelhado(s) que confere uma instabilidade química, sendo altamente reativos e podem gerar toxicidade se reagir com DNA, RNA, proteínas e lipídeos. Os radicais livres incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) como radicais de superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxila (OH), hidroperoxila ( $HO_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $O_2$ ); e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Quando a geração de ROS excede a capacidade da célula de metabolizá-los e desintoxicá-los, surge um estado de estresse oxidativo (ZIECH et al., 2011).

$H_2O_2$  tem um papel fundamental na fisiologia pela sinalização funcional. A geração de  $H_2O_2$  é estimulada por sinais metabólicos ou estresse intracelular, com concentração na faixa de nanomolar sendo importante para sinalização redox via oxidação. Além de contribuir para vários processos como proliferação celular, diferenciação e angiogênese pela oxidação de enxofre em proteínas-alvo e ativação das vias de sobrevivência responsivas ao estresse. As ROS em excesso são nocivas e por isso é necessário manter a homeostase redox, que ocorre por um sistema de defesa antioxidante que atuam neutralizando as ROS (WANG et al., 2021).

Os antioxidantes são divididos em moléculas não catalíticas e antioxidantes catalíticos, em que há um equilíbrio no sistema redox em uma situação fisiológica normal. Entretanto, o equilíbrio pode ser interrompido desencadeando o estresse oxidativo e aumentando os níveis de ROS, implicando em doenças como câncer (WANG et al., 2021).

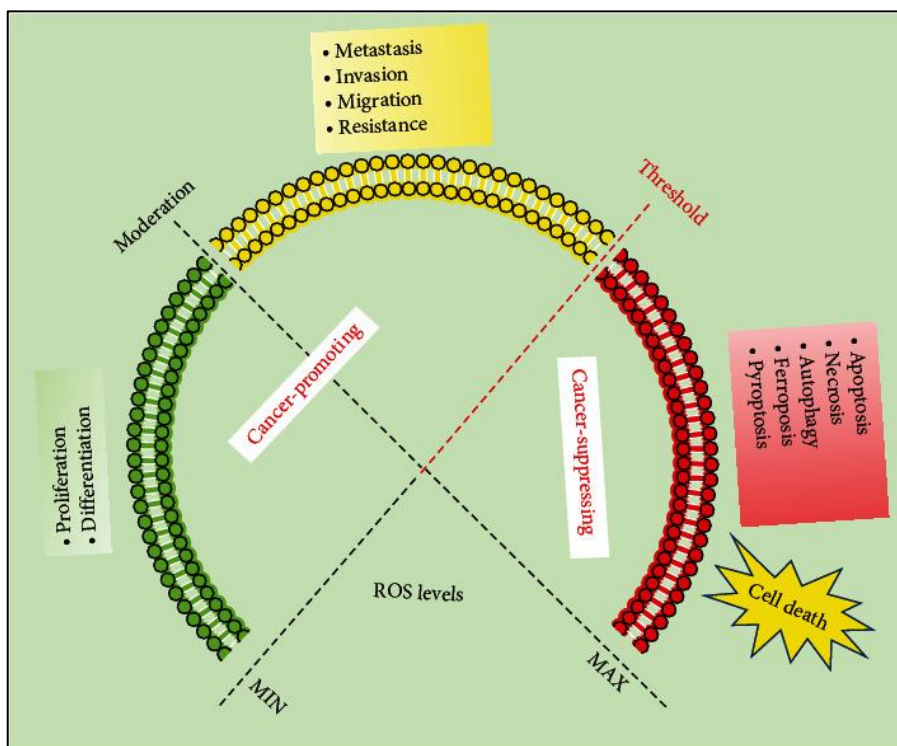
Há décadas as ROS se destacam por ser um componente chave no câncer,  $H_2O_2$  é a principal ROS que participa da sinalização celular e está envolvida com diversos *hallmarks* do câncer descrito por Hanahan e Weinberg (HANAHAN; WEINBERG, 2011), pois atua como segundo mensageiro no crescimento celular, no metabolismo do câncer, na apoptose, na instabilidade gênômica, e pode interferir na angiogênese pela inativação oxidativa de VEGFR2, também promove motilidade celular, atua em células imunes envolvidas na inflamação, ativa de células imunes no câncer, e entre outras funções (Figura 8) (KANG; LEE; LEE, 2018).

Figura 8. *Hallmarks* do câncer relacionados com  $H_2O_2$ 

Fonte: KANG; LEE; LEE, 2018.

Curiosamente, o estresse oxidativo pode ativar mecanismos de morte ou sobrevivência celular dependendo da severidade e exposição do excesso de ROS. Há a indução de proliferação e diferenciação em células normais e de câncer em baixas concentrações de ROS. Em concentrações moderadas tem uma relação com a iniciação do tumor, progressão, invasão, metástase e resistência quimioterápica. Já em altas concentrações de ROS resulta em dano celular, mutações genéticas, promove transformação de células normais no câncer ou indução de apoptose, necrose, autofagia, ferroptose e piroptose (WANG et al., 2021) (Figura 9).

Figura 9. Funções promotoras e supressoras do câncer relacionadas com os níveis de ROS



Níveis baixos de ROS em verde com aumento de proliferação e diferenciação.

Níveis moderados de ROS em amarelo com aumento de metástase celular, invasão, migração e resistência. Níveis altos de ROS (acima do *threshold*) induz a ativação da via de morte de células de câncer.

Fonte: WANG *et al.*, 2021.

O papel das ROS é complexo por operar em diversas vias bioquímicas na progressão do câncer e em condições normais. A influência das ROS no desenvolvimento do câncer é contraditória, pois a redução ou aumento dos níveis intracelulares de ROS podem ser uma potencial estratégia de prevenção do câncer. Portanto, terapias moduladoras de ROS podem ter um efeito terapêutico importante para células tumorais. Apesar da maioria das moléculas em estágios de desenvolvimentos clínicos não entrarem para o tratamento clínico do câncer, existem vários medicamentos aprovados pela FDA com base na regulação de ROS como uma terapêutica válida e nova contra o câncer (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009; WANG *et al.*, 2021).

## PEROXIRREDOXINAS

Em 1988, foi descoberto uma proteína contendo radical de enxofre capaz de atuar como *scavenger* (sequestrador) de ROS, que não possuía nenhuma atividade antioxidante conhecida como era encontrado na catalase, glutathiona peroxidase ou superóxido dismutase. Após anos, foi intitulado como família de proteínas peroxirredoxina (PRDX), que ainda não é totalmente

compreendida, tendo seu papel relevante na tumorigênese no contexto de ROS (CHAE; CHUNG; RHEE, 1994; KIM et al., 1988; NEUMANN; FANG, 2007). Já foi visto o papel de enzimas antioxidantes na supressão tumoral pela proteção na integridade genômica celular contra as ROS (NEUMANN; FANG, 2007).

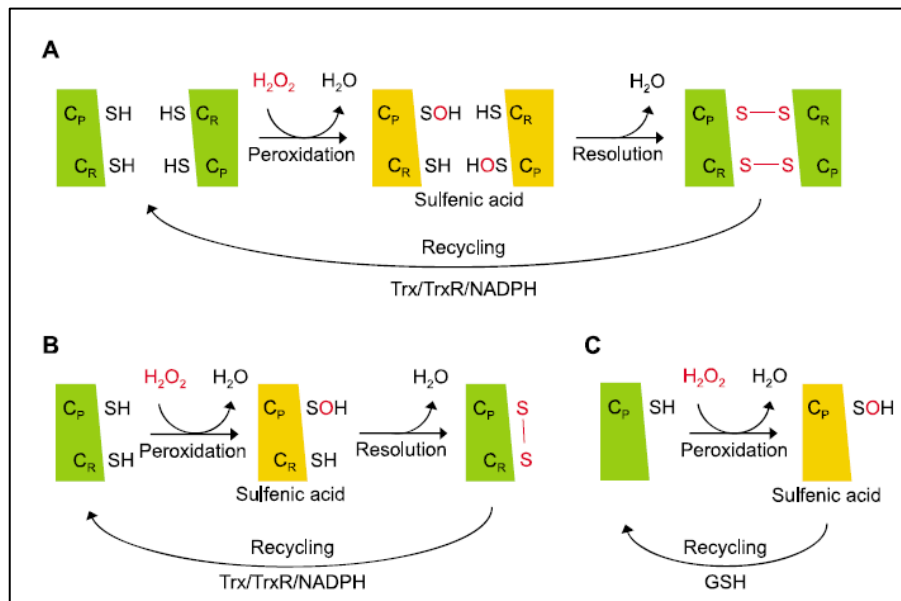
A sinalização da PRDX é mediada por peróxidos, sendo assim, são peroxidases baseadas em cisteína que não requer cofatores para sua ativação, com capacidade de regular funções celulares em eucariotos. As PRDXs são enzimas responsáveis pela defesa antioxidante, implicando em mais de 90% das reduções de peróxidos celulares (VEAL et al., 2018).

As PRDXs estão distribuídas em diversas organelas e protegem as células contra o estresse oxidativo pela redução do acúmulo de ROS e RNS intracelular. Desse modo, a PRDX pode modular a função supressora ou promotora de tumores (NICOLUSSI et al., 2017), além de estar associada com resistência à quimioterapia (PERKINS et al., 2015), regulando vias de sinalização de forma redox-dependente ou independente através da interação com outras proteínas de sinalização (KIM; JANG, 2019).

Os papéis fisiológicos dos PRDXs são separados conforme suas características estruturais e funcionais. Dessa forma, são classificadas em subfamílias que variam em distribuição filogenética, localização celular, oligomerização, mudança de conformação e suscetibilidade à inativação hiperoxidativa. Todas as PRDXs possuem a cisteína altamente reativa (peroxidásica, CPSH), que forma um ácido sulfênico (CPSOH) na reação com o peróxido. As subfamílias são divididas de acordo com o mecanismo catalítico de redução de CPSOH:

- A. PRDX 2-Cys típico: faz a oxidação de resíduos de CPSH em ácido sulfênico por  $H_2O_2$ , seguido pela formação de uma ligação dissulfeto intermolecular com a cisteína de “resolução” (CRSH) de outra subunidade de PRDX. Por fim, a PRDX oxidada sofre redução pela tiorredoxina / tiorredoxina redutase / NADPH. São quatro isoformas: a PRDX1 e PRDX2 citosólicas e nucleares, PRDX3 mitocondrial e PRDX4 no retículo endoplasmático.
- B. PRDX 2-Cys atípico: é semelhante a PRDX 2-Cys típica, exceto que medeiam a formação de uma ligação dissulfeto intramolecular com o CRSH da mesma subunidade PRDX. A isoforma PRDX5 nos peroxissomos, mitocôndria e citosol.
- C. 1-Cys PRDX: possui apenas um resíduo Cys conservado, de modo que são reciclados em ácido sulfênico sem formar uma ligação dissulfeto, que é reduzida por glutathione em vez de tiorredoxina. CRSH está ausente, outros tióis estão envolvidos na reação com CPSOH. A isoforma PRDX6 no citosol (KIM; JANG, 2019; PESKIN; WINTERBOURN, 2021) (Figura 10).

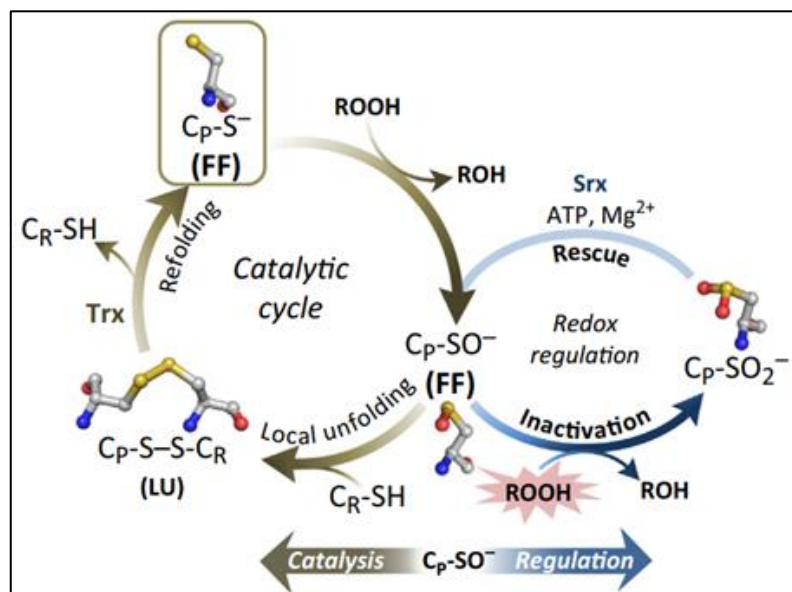
Figura 10. Ciclo catalítico das isoformas de peroxirredoxina (PRDX)



Fonte: KIM; JANG, 2019.

As PRDXs do grupo 2-Cys possuem os ciclos catalíticos e regulatórios. O ciclo catalítico segue o ciclo normal da oxidação mediada pelo peróxido até a ligação dissulfeto e reciclagem redutiva pela tioredoxina. Enquanto o ciclo de regulação redox aparece predominantemente em eucariotos, em que o sulfenato de cisteína peroxidásica se torna ainda mais oxidado na presença de altos níveis de peróxido, ao sulfinato inativo ( $C_p-SO_2^-$ ) que pode ser restaurada pela atividade de ATP e sulfiredoxina (Srx) (PERKINS et al., 2015) (Figura 11).

Figura 11. Atividade das peroxiredoxinas



Fonte: PERKINS et al., 2015.

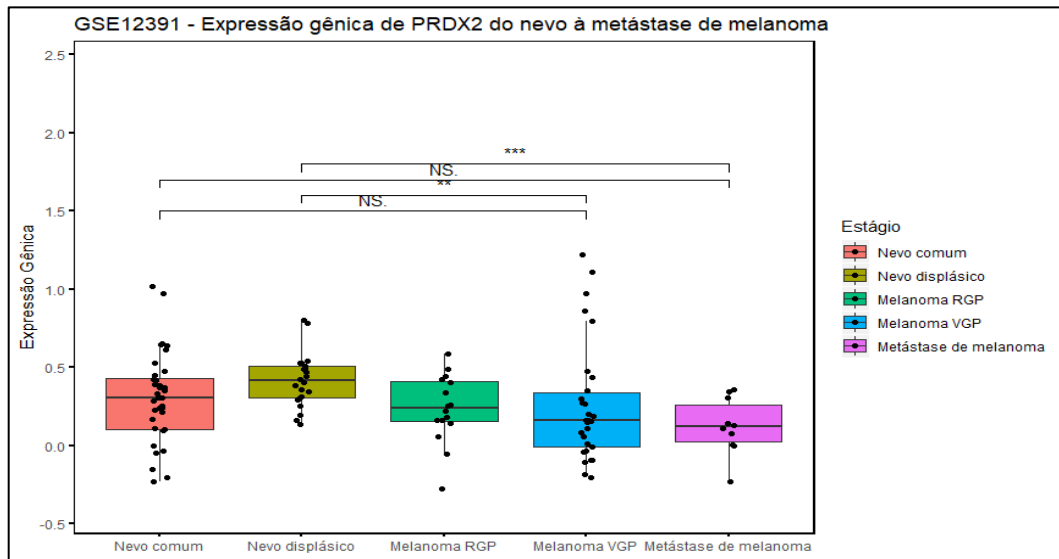
PRDX1 e PRDX2 são abundantes em citosol, mas também podem ser encontrados no núcleo (PARK et al., 2014), o que as levou a serem mais estudadas, focando em sua expressão e interação com proteínas sinalizadoras no câncer. Uma revisão mostra a alteração na expressão de 2-Cys PRDX em vários tipos de cânceres (como câncer de mama, de tireoide, de bexiga, e estômago), assim como, o silenciamento específico de PRDX mostra que os subtipos de 2-Cys PRDX têm papéis distintos na tumorigênese e no desenvolvimento do câncer (KANG et al., 2005; KANG; LEE; LEE, 2018).

A produção de ROS pode ocorrer durante a fosforilação oxidativa e por outras fontes intracelulares, ou pode ocorrer de maneira exógena, pelo tabaco ou radiação ultravioleta (UV), capazes de diminuir os níveis de antioxidantes levando ao desbalanço redox. Hintsala e colaboradores (2015) demonstraram que a expressão de PRDX1 e PRDX2 foram significativamente reduzidas em melanomas malignos quando comparado a tumores benignos, confirmando o papel das PRDX contra danos celulares induzido por UV (HINTSALA et al., 2015). Esses dados despertam o maior interesse em explorar a regulação redox no microambiente do melanoma.

Um estudo mostrou que PRDX1 e PRDX2 estão diminuídas no melanoma metastático em comparação com o nevo, e podem ser usados como biomarcadores da progressão da doença. A figura abaixo da expressão gênica de *PRDX2*, mostra uma diminuição significativa no melanoma e melanoma metastático em relação ao nevo displásico (Figura 12) (CARVALHO et al., 2022).



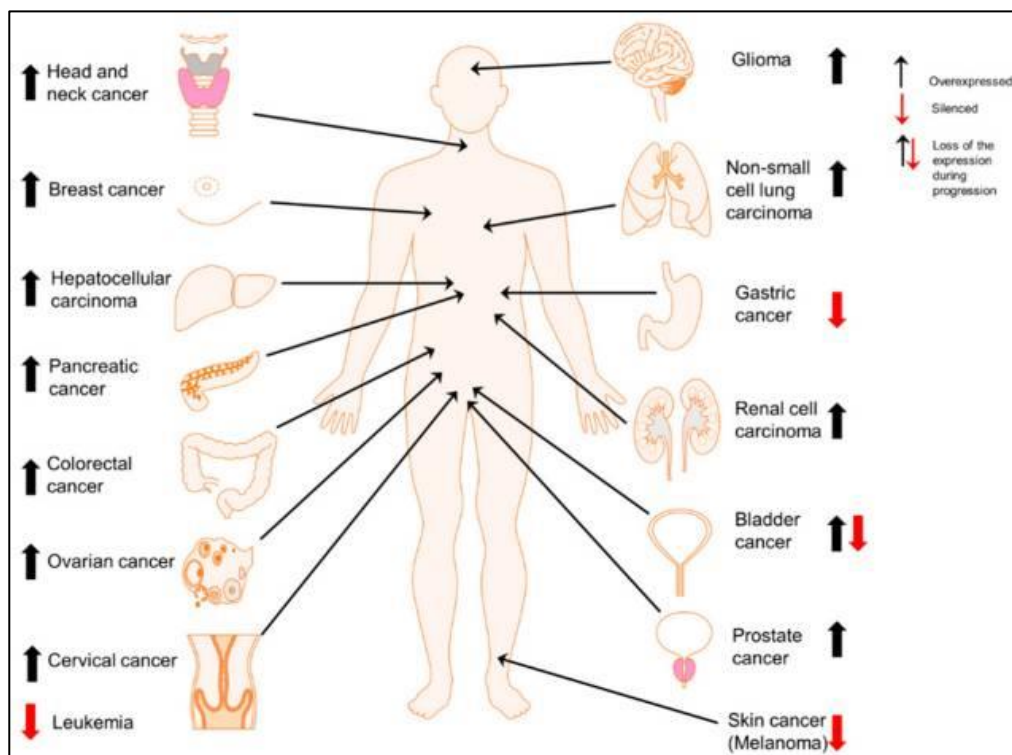
Figura 12. Expressão gênica de *PRDX2* no nevo à melanoma metastático



Melanoma RGP: em fase de crescimento radial; Melanoma VGP: em fase de crescimento vertical.  
 Fonte: CARVALHO *et al.*, 2022.

Estudo de Hintsala e colaboradores, demonstrou que a expressão de *PRDX1* e *PRDX2* foram significativamente menores em melanomas malignos comparado a tumores benignos. Altos níveis de antioxidante podem ser relacionados com o baixo estresse oxidativo e redução de danos no DNA e danos intracelulares em tumores, portanto uma melhor sobrevida do paciente (HINTSALA *et al.*, 2015). *PRDX2* tem diferentes expressões dependendo do tipo câncer, uma maior expressão nos cânceres de cabeça e pescoço, mama, fígado, pancreático, colorretal, ovariano, cervical, cérebro (glioma), pulmão, e câncer de próstata e expressão epigeneticamente silenciada de *PRDX2* em câncer gástrico, melanoma e leucemia (Figura 13) (CHANDIMALI; JEONG; KWON, 2018).

Figura 13. Expressão de PRDX2 nos diferentes tipos de tumores

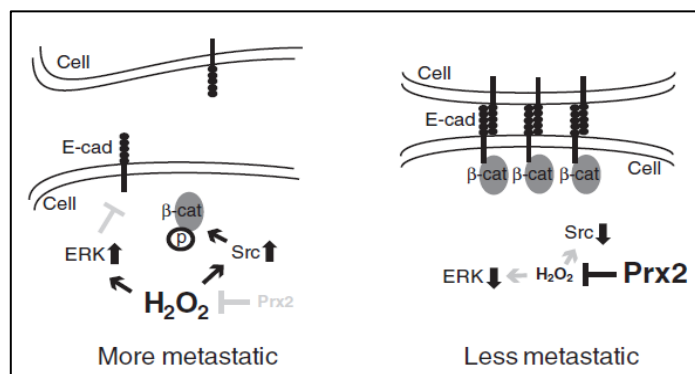


Fonte: CHANDIMALI; JEONG; KWON, 2018.

A PRDX2 reduz peróxidos na presença de NADPH pelo acoplamento ao sistema tiorredoxina/tiorredoxina redutase, como já visto, e está regulada negativamente em melanoma metastático (DE SOUZA et al., 2006). Foi demonstrado em melanoma com ou sem mutação em BRAF que o silenciamento de *PRDX2* levou ao acúmulo de  $H_2O_2$  intracelular, resultando na quebra de complexos E-caderina/ $\beta$ -catenina em junções aderentes por meio das vias Src/ERK, culminando na transição fenotípica e consequente aumento de migração celular e metástase. PRDX2, portanto, é um candidato a supressor de metástase ao induzir a estabilidade de junções aderentes (Figura 14) (LEE et al., 2013).

Figura 14. Mecanismo envolvido na expressão de PRDX2 em junções aderentes pelo

complexo E-caderina/  $\beta$ -catenina



Fonte: LEE *et al.*, 2013.

O tratamento com o composto natural gliotoxina, que mimetiza a atividade de PRDX2, foi capaz de inibir a proliferação e migração de células de melanoma com baixa expressão de PRDX2, e também inibir sua metástase para o pulmão (LEE *et al.*, 2013). Por isso o interesse em aprofundar os estudos com este composto, cujos resultados apresentaremos adiante.

#### MODULADORES DA ATIVIDADE DE PRDX

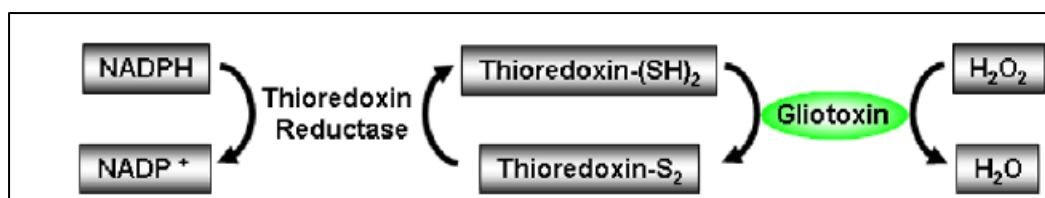
O acúmulo de ROS é um dos fatores iniciais no processo neoplásico, que leva a adaptações metabólicas e maiores danos ao DNA em células normais, acarretando crescimento e proliferação celular. Diversos estudos têm sugerido moléculas inibidoras de ROS na prevenção da tumorigênese, agindo como *scavenger* na modulação dos níveis de ROS (WANG *et al.*, 2021). Alguns compostos foram identificados como inibidores de 2-Cys PRDX, o primeiro inibidor descoberto foi a “Conoidina A” pela inibição da atividade da peroxidase em parasita, que atualmente já foi observado sua ação inibitória em PRDX1 e PRDX2 humana (LEE *et al.*, 2019). Outro composto com potencial inibitório de PRDX1 e 2 foi a adenantina, que foi posteriormente indicado como inibidor seletivo de tioredoxina redutase. Por outro lado, há compostos que mimetizam a atividade de 2-Cys PRDX que se demonstraram eficazes na inibição das metástases em melanoma, como a gliotoxina (KANG; LEE; LEE, 2018).

A gliotoxina é um metabólito secundário identificado como principal fator de virulência em pacientes com aspergilose com funções imunossupressoras, e desde a descoberta de sua estrutura em 1958 (BELL *et al.*, 1958), tornou-se alvo de extensas investigações para explorar seu complexo mecanismo de ação para o desenvolvimento potencial de uma terapia anti-câncer (GARDINER; WARING; HOWLETT, 2005; HUBMANN *et al.*, 2017).

A gliotoxina (GT) exerce uma atividade semelhante a PRDX, pois é um eficiente catalisador

da redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença do sistema tiorredoxina/ tiorredoxina redutase. A atividade de GT também depende da sua concentração e de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sendo assim, a GT poderia participar do sistema redox da tiorredoxina na substituição da PRDX (Figura 15) (Choi et al., 2007).

Figura 15. Modelo esquemático da atividade da gliotoxina em reduzir  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependente de tiorredoxina



Fonte: LEE *et al.*, 2007.

Os níveis nanomolares de gliotoxina podem proteger contra o dano oxidativo ao converter  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água nas células HeLa, onde funciona como receptor de elétrons do NADPH no sistema redox da tiorredoxina (CHOI et al., 2007). A GT inibiu a proliferação e migração, bem como a metástase pulmonar de células de melanoma deficientes em PRDX2. Este estudo *in vivo* implicou na capacidade da gliotoxina como mimético de PRDX2, sendo um composto terapêutico promissor para prevenir a metástase do melanoma (DOLAN et al., 2015; LEE et al., 2013). Por outro lado, altas concentrações de GT podem elevar os níveis de ROS promovendo um efeito citotóxico e oxidativo com morte celular pela via apoptótica, já visto em linhagens de células hepáticas (CHOI et al., 2007).

A gliotoxina é absorvida pelas células eucariontes dependentes de glutathione, após a absorção intracelular a GT é reduzida à forma de ditiol e resulta na depleção de glutathione e formação de glutathione dissulfeto. Em seguida, ocorre a oxidação de ditiol gliotoxina para gliotoxina levando a apoptose. A morte celular por apoptose ocorre pela ativação do membro da família pró-apoptótica Bcl-2 formadora de poros Bak para induzir a geração de ROS, a liberação mitocondrial de fatores apoptogênicos e a ativação da caspase-3. A GT sai da célula de maneira pseudocatalítica e pode ser absorvida por células adjacentes para continuar os efeitos citotóxicos (DOLAN et al., 2015).

O uso de pequenas moléculas que modificam covalentemente suas proteínas-alvo, promovendo assim a modulação de sua atividade, se constitui em uma importante ferramenta para os estudos de vias moleculares específicas (KANG; LEE; LEE, 2018).

## BIOMARCADORES PARA PROGNÓSTICO DO MELANOMA

Melhores ferramentas de prognóstico são necessárias para identificar os riscos de progressão tumoral e metástases nos indivíduos com objetivo de fornecer tratamento precoce, combinado com as características clínicas e patológicas do paciente. Existem vários biomarcadores emergentes para o diagnóstico, prognóstico e previsão do resultado terapêutico em vários tipos de tumor, e estes são cada vez mais viáveis de avaliar com novas tecnologias laboratoriais (DING et al., 2022). Biomarcadores séricos de moléculas (enzimas, ácidos nucleicos livres, antígenos), proteínas solúveis e metabólitos que são liberadas das células de melanoma para o líquido extracelular e podem alcançar a corrente sanguínea, importante para o monitoramento do tratamento e diagnóstico de melanoma. Porém, biomarcadores aplicados em ensaios imuno-histoquímicos e histológicos são indispensáveis na terapia do melanoma (NAIK, 2021).

Os biomarcadores de prognóstico vão desde expectativa de sobrevida até possível recidiva do tumor, e são exigidos a adoção pelo Comitê Conjunto Americano de Câncer (AJCC) ou outros protocolos de estadiamento semelhantes antes de serem amplamente utilizados. Um biomarcador com boas características de teste deve ser integrado em uma base de preparação para a tomada de decisão clínica para permitir sua utilidade (NAIK, 2021).

Por exemplo, a proteína de ligação Y-box 1 (YB-1) é um fator de transcrição oncogênico e regulador translacional que participa da transição epitelial-mesenquimal (EMT) de células tumorais, proliferação celular e metástase. Já observaram o aumento da expressão de YB-1 correlacionado com a diminuição da sobrevida global (OS). Pois a sua superexpressão promove a tradução de proteínas envolvidas na tumorigênese no melanoma, principalmente na EMT que aumenta a migração e invasão das células de melanoma. Verificaram que os níveis de YB-1 estavam correlacionados com o OS, o que sugere um papel prognóstico adverso de YB-1 no melanoma primário (DING et al., 2022).

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Investigar o papel da peroxirredoxina 2 em melanoma com mutação em NRAS e como sua presença ou ausência afeta o fenótipo celular. Além disso, avaliar as possíveis vias e

mecanismos de ação envolvidos.

### Objetivos específicos

- Caracterizar as linhagens de melanoma com mutação em NRAS em níveis basais de PRDX2;
- Avaliar o potencial da terapia com gliotoxina, na possibilidade de mimetizar a atividade de PRDX2 nas linhagens NRAS-mutadas e consequente redução na capacidade de invasão e/ou proliferação.
- Utilizar silenciamento de expressão gênica para o gene de *PRDX2* por *shRNA*, na linhagem com expressão de PRDX2 (SKMEL-173), verificando se a ausência ou diminuição desse gene altera a sua capacidade invasiva e/ou proliferativa.
- Analisar o papel da PRDX2 em pele humana reconstruída contendo melanoma com mutação em NRAS e as linhagens silenciadas para *PRDX2*.
- Avaliar a expressão de PRDX2 e genes associados com a alteração do perfil fenotípico e invasão do melanoma (como MITF, AXL, SOX10, SNAIL, SMAD).
- Avaliar a correlação de PRDX2 com a sobrevida e estadiamento dos pacientes com melanoma e identificar os genes correlacionados por análises de bioinformática.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultura celular e manutenção

Para os ensaios em monocamada foram utilizadas as linhagens de melanoma humano com mutação em NRAS: SK-Mel-147 e SK-Mel-173 (Tabela 1) e como controle utilizou-se células primárias de melanócitos e fibroblastos. As células foram cultivadas a 37° C em placas de cultura contendo meio de crescimento DMEM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), juntamente com antibióticos (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em estufa de cultura celular com 5% de CO<sub>2</sub>, para manutenção de pH próximo ao fisiológico. Ao atingirem 70-80% de confluência, as células foram lavadas com solução de PBS A 1X (pH: 7,2) (tampão fosfato salino livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) e então subcultivadas com auxílio de tripsina 0,1%.

As linhagens de melanoma foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. María Soengas do Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas de Madrid, Espanha. As células primárias de pele humana foram isoladas a partir de amostras de pele obtida de cirurgias plásticas mamárias e/ou postectomia

realizadas no Hospital Universitário da USP (CEP/HU-USP 943/09, SISNEP CAAE 0062.0.198.000-9) conforme aprovação pelo comitê de ética (CEP/FCF-USP 534) e FCF/USP no CAAE: 76737917.5.1001.0067. Após a extração, as células foram armazenadas no banco de células sob criopreservação. Todas as células extraídas, e antes de serem utilizadas, foram avaliadas para a presença de microrganismos (HPV (*Papilomavírus* Humano), HSV-1 e 2 (Herpes Simplex Virus), Citomegalovírus, Hepatite B, Hepatite C, HIV-1, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Treponema pallidum* e *Trichomonas vaginalis*) por técnica de PCR.

Tabela 1. Região da mutação em melanoma NRAS mutante

<b>Linhagem</b>	<b>Mutação</b>
<b>SK-MEL-147</b>	NRAS p.Gln61Arg (c.182A>G) Q61R (PubMed= <a href="#">21725359</a> ; PubMed= <a href="#">24576830</a> ; PubMed= <a href="#">25728708</a> ).
<b>SK-MEL-173</b>	NRAS p.Gln61Lys (c.181C>A) Q61K (PubMed= <a href="#">21725359</a> ; PubMed= <a href="#">24576830</a> ).

Fonte: <https://web.expasy.org/cellosaurus>

Boas práticas de cultura de células: PCR para a detecção de *Mycoplasma sp.*

Foi monitorado a contaminação por *Mycoplasma sp.* nas culturas celulares para o controle de qualidade de pesquisa no laboratório. Coletamos 1,0mL do sobrenadante da cultura celular, após ser metabolizado por 48h, e então centrifugado. Por meio de PCR convencional foi detectada a presença de *Mycoplasma sp.* utilizando 10µL de amostra e 20µL de mix (9,7µL de água deionizada autoclavada, 4,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 nM, 3 µL PCR *buffer* 10X, 1 µL de primer oligo *sense* (5' GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG 3'), 1 µL de primer oligo *anti-sense* (5' CGG ATA ACG GTT GCG ACC TAT 3'), 0,6 µL de dNTP e 0,2 µL de Taq polimerase 5 U/µL). O ciclo utilizado foi de 7 min a 94°C, 1 min a 94°C + 1 min a 60°C + 1,5 min a 72°C por 30 vezes, e 10 min a 72°C. As amostras amplificadas foram submetidas à corrida de eletroforese (100V, 300mA, 35min) em gel de agarose 2% com solução de 0,01% de *GelRed*® (Biotium, EUA). As bandas foram detectadas com transluminador, as bandas fluorescentes na margem de 400 a 500 pares de bases foram consideradas positivas para contaminação por *Mycoplasma sp.* Caso o resultado seja positivo, as respectivas linhagens contaminadas foram descartadas.

### Certificação das linhagens celulares de melanoma

A extração do DNA genômico das linhagens celulares foi realizada com o kit comercial da QIAamp DNA Mini Kit. As células que estavam mantidas em cultura foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS estéril, seguindo as etapas da extração de acordo com o protocolo do fabricante. Obtendo assim, o filtrado de DNA puro e conservados em isopor com gelo. A quantificação da concentração de DNA genômico extraído das linhagens celulares foi realizada para garantia a qualidade e pureza a amostra. Utilizando o espectrofotômetro da Thermo Scientific NanoDrop. O aparelho de espectrofotômetro mede a concentração de ácidos nucléicos com 1-2  $\mu\text{L}$  da amostra identifica por fibras óticas contidas no pedestal, calcula A260 e A280 pela absorbância em 365nm e a razão de A260/A280 informa a pureza da amostra. Após a quantificação de DNA e verificação da pureza da amostra, esse material é enviado para as análises de autenticação das linhagens celulares pelo método de STR (*short tandem repeats markers*) para atestar a genuinidade das linhagens por sua genotipagem. Os loci gênicos avaliados foram TH01, TPOX, Vwa, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818 e Amelogenina. Correspondendo a 100% da linhagem identificada (Figura 16).

Figura 16. Resultado das certificações por STR das linhagens de melanoma com mutação em NRAS, utilizadas neste trabalho

Loci	Resultado do Teste / Test Result (amostra/sample)				Loci	Resultado do Teste / Test Result (amostra/sample)			
	Perfil da Amostra / Query Profile SKMEL-147					Perfil da Amostra / Query Profile SKMEL-173			
TH01	6	9.3			TH01	7	9.3		
TPOX	8	12			TPOX	8			
vWA	17	18			vWA	18			
CSF1PO	10	12			CSF1PO	10	11		
D16S539	12	13			D16S539	11	12		
D7S820	9	11			D7S820	9	11		
D13S317	9	11			D13S317	9	11		
D5S818	10	13			D5S818	9	11		
D21S11					D21S11				
Amelogenin	x				Amelogenin	x	y		

Fonte: Elaboração Própria.

### Ensaio de viabilidade celular – Curva de morte

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de curva de morte após exposição ao tratamento com Gliotoxina (Sigma-Aldrich /G9893-5MG) solubilizada em DMSO (10 $\mu\text{M}$ ). Em



placa de 24 poços foram semeadas  $2 \times 10^4$  células e, após aderência, foram tratadas com diferentes concentrações de gliotoxina (0, 50, 100, 200 e 400 nM). Nos tempos 24h as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, e o pellet foi ressuspensão em Azul de Tripán 0,4% em PBS. O controle utilizado foi meio puro de DMEM, pois os tratamentos utilizados em doses nM representa uma quantidade  $<0,01\%$  de DMSO, não apresentando toxicidade pelo veículo. Para a contagem do número total de células utilizou-se a câmara de Neubauer e foi realizado o cálculo da curva de dose-resposta que representa a concentração do composto para qual 50% do efeito é observado (IC<sub>50</sub>) através da regressão não-linear pelo software *GraphPad Prism 7.0*.

#### Curva de crescimento – Ensaio de Exclusão do Azul de Tripán

A curva de crescimento foi avaliada através da contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando o método de exclusão do corante Azul de Tripán (T6146, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As linhagens celulares foram plaqueadas em concentração de  $1 \times 10^4$  células/poço – 24 poços) em triplicata, e após o período de 24, 72, 120, e 168 horas foram contadas. Para isso, as células foram coletadas com o auxílio de tripsina 0,1%, foram descartados os sobrenadantes e ressuspensas em meio D-10. Em seguida, foram incubadas com solução Azul de Tripán (0,4% em PBS-A) por aproximadamente 5 minutos. Neste ensaio, as células não viáveis podem ser identificadas pela coloração azul e contadas sob microscópio ótico, enquanto que células viáveis não são permeáveis ao corante (LIU, FU, MEYSKENS, 2009).

#### Avaliação da expressão proteica por Western Blotting

Os lisados celulares para Western Blotting (WB) foram preparados em tampão RIPA com coquetel de inibidores de protease (Roche, Penzberg, Upper Bavaria, Alemanha) e com coquetel de inibidores de fosfatases I e II (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). A proteína total (40 µg) foi submetida a eletroforese em gel SDS com gradiente de 4-20% em condições redutoras e subsequente transferência para membrana PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA). A membrana é bloqueada com BSA 5% diluído em TBS-Tween 20 (50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM de NaCl, 0,1% Tween-20) por 1 hora e testados os seguintes anticorpos: PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, ERK, ERK-fosforilado, MITF, AXL, SOX10, SNAIL, β-catenina, E-caderina, N-caderina e β-actina nas concentrações recomendadas pelo fabricante (Tabela 2). As bandas de proteínas foram detectadas por quimioluminescência aumentada (ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA)

e semiquantificadas no software Image J.

Tabela 2. Lista de anticorpos utilizados, utilizados no ensaio de Western Blotting

Anticorpos	Secundários	Diluições	Referências	Fornecedores
Anti-Peroxiredoxin 1/PAG	Rabbit	1:1000	ab41906	Abcam
Anti-Peroxiredoxin 2/PRP	Rabbit	1:1000	ab133481	Abcam
Anti-Peroxiredoxin 3/PRDX3	Rabbit	1:1000	ab128953	Abcam
Anti-Peroxiredoxin 4	Rabbit	1:1000	ab59542	Abcam
ERK1/2	Rabbit	1:2000	#91015	Cell Signaling Technology
p-ERK1/2	Rabbit	1:2000	#91025	Cell Signaling Technology
Anti-MiTF	Mouse	1:1000	ab12039	Abcam
Anti-Axl	Rabbit	1:1000	ab240396	Abcam
Anti-SOX10	Rabbit	1:1000	ab155279	Abcam
Snail (C15D3)	Rabbit	1:1000	#3879	Cell Signaling Technology
Anti-beta Catenin	Rabbit	1:1000	ab32572	Abcam
E-Cadherin (24E10)	Rabbit	1:1000	#3195	Cell Signaling Technology
Anti-N Cadherin	Rabbit	1:1000	ab76011	Abcam
Anti-β-Actin-Peroxidase	Mouse	1:50000	A3854	Sigma-Aldrich

Abreviatura: p – fosforilado.

Fonte: Elaboração Própria.

#### Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real

O RNA total das linhagens celulares foi extraído utilizando o RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), segundo as informações do fabricante. Este foi aquecido a 65°C por 5min, e quantificado através do espectrofotômetro de luz a 260nm e sua qualidade é verificada pela relação  $A_{260}/A_{280}$ . Para a reação de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) foi utilizado o método Taqman® (Life Technologies, EUA). Os cDNAs obtidos das amostras foram diluídos para a concentração de 2 µg/µL. As reações são feitas para um volume final de 10 µL contendo 0,5µL da mistura de pares de primers (*forward* e *reverse*) de cada gene, 1 µL de cDNA, 5 µL de 2x Taqman® Gene Expression Master Mix (Life Technologies, EUA), e 3,5 µL de água livre de RNase. Os primers específicos para os genes *MITF*, *AXL*, *SOX10*, *TXN*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SNAI1*, *SNAI2*, *FNI* e *PRDX2* (Tabela 3). Para a análise do mRNA, o nível relativo de expressão gênica é calculado em relação à expressão dos controles endógenos

(*GAPDH*) utilizando o método Ct (*cycle threshold method*) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3. Iniciadores (*Primers*) utilizados no ensaio de RT-PCR

<b>Gene</b>	<b>Código do primer</b>
MITF	Hs01117294_m1
AXL	Hs01064444_m1
SOX10	Hs00366918_m1
TXN	Hs01555214_g1
SMAD2	Hs00183425_m1
SMAD3	Hs00969210_m1
SNAI1	Hs00195591_m1
SNAI2	Hs00950344_m1
FN1	Hs01549976_m1
PRDX2	Hs00853603_s1
GAPDH	Hs02786624_g1
SOD1	Hs00533490_m1
SOD2	Hs00167309_m1
GSTP1	Hs00943350_m1

Fonte: Elaboração Própria.

### Ensaio Clonogênico

Foram utilizadas 1000 células em placas de 6 poços. Após a adesão das células (24h), estas foram tratadas em diferentes concentrações, de acordo com os resultados obtidos na curva de morte. O meio de cultura foi trocado de 2 a 3 dias e a gliotoxina adicionada, por um período de 15 dias variando de acordo com a linhagem utilizada. Após o período para a formação das colônias, os poços foram lavados com PBSA, e as colônias formadas foram fixadas e coradas com solução de 49,75% metanol, 49,75% água deionizada e 0,5% cristal violeta. As placas foram fotografadas para comparar o efeito do tratamento e a análise de número de colônias e a área ocupada por estas será realizada conforme Guzmán e colaboradores (GUZMÁN et al., 2014).

### Ensaio para avaliação do potencial dos tratamentos na invasão celular

A capacidade de invasão das células de melanoma foi avaliada após o tratamento das linhagens em membranas de Transwell (8mm pore size, Becton Dickinson). Essas foram cobertas com 30 µL de Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, diluído 1:6 em DMEM livre de SFB). As células foram ressuspensas ( $5 \times 10^4$  células/poço) em DMEM livre de SFB e adicionadas no compartimento superior da câmara. Então, 750 µL de DMEM suplementado com 10% de SFB foram adicionados na câmara inferior. Os tratamentos foram utilizados em ambos os compartimentos, superior e inferior. Após 24h, as células que migraram através do

Matrigel foram fixadas em formaldeído 4% (PBS 1x), coradas com cristal violeta 1% (em metanol) por 20 minutos antes da contagem em microscópio invertido (Axiovert S100, Zeiss, Germany). Em cada poço foram contados 5 campos aleatórios representativos e independentes (objetiva de 20x).

#### Ensaio para avaliação do potencial dos tratamentos na migração celular

Avaliação da capacidade de migração das células de melanoma após o tratamento, foram semeadas  $5 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços. Após atingirem confluência de aproximadamente 90% com o auxílio de uma ponteira de 200  $\mu$ L foram feitas fendas (“feridas”) no centro de cada poço. Então, as células foram lavadas com PBS 1x e adicionados os tratamentos com meio de cultura DMEM + 1% de SFB. O experimento foi realizado até o momento em que a fenda tenha se fechado nos controles, com fotos pelo microscópio. As análises das áreas livres de células serão realizadas com o software Image J.

#### Ensaio de avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por diidrorodamina 123 (DHR)

As células foram semeadas em placas escuras de 96 poços, na densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço. A adêrencia das células ocorreu em *overnight*, então esses poços foram lavados com PBS e tratados ou não com GT e  $H_2O_2$  (200  $\mu$ M) durante 10 minutos. Após esse período, as células foram novamente lavadas com PBS, incubadas com PBS + 1 g/L de glicose e diidrorodamina 123 (DHR 123, nº catálogo D23806, ThermoFisher) a 10  $\mu$ M por 3 horas (180 minutos). A leitura da fluorescência foi feita a cada 10 minutos em equipamento espectrofotômetro com excitação de 485 nm e emissão em 528 nM.

#### Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Detecção de fatores solúveis em PHR e monoculturas utilizando o sobrenadante dessas culturas e estocados à  $-80^\circ\text{C}$  para ser realizado o ensaio de ELISA (R&D Systems) por kit comercial, seguindo a instrução do fabricante: IL-8 (R&D Systems®, Catalog # AF-208-NA) e IL-6 (R&D Systems®, Catalog # DY-206-NA).

Silenciamento gênico de *PRDX2* através de vetores lentivirais

O silenciamento do gene *PRDX2* em linhagens celulares foram realizados a partir de sequências *short-hairpin* RNA (*shRNA*) para inibição do RNA mensageiro (RNAm) desse gene. Utilizando culturas bacterianas transfectadas com a sequência plasmidial do Mission *shRNA* (Sigma, USA). Foram utilizadas três sequências diferentes de *shRNA* para *PRDX2* que inibem regiões distintas do RNAm (Tabela 4).

Tabela 4. Sequências de shRNA para inibição de PRDX2

Código do estoque bacteriano	Identificação	Sequências	<i>PRDX2</i> -201	<i>PRDX2</i> -202
TRCN0000064905	PRDX2-1	CAGACGCTTGTCTGAGGATTA	Éxon 4	Éxon 4
TRCN0000064906	PRDX2-2	GTGAAGCTGTCGGACTACAAA	Éxon 2	Éxon 2
TRCN0000064907	PRDX2-3	GCCTGGCAGTGACACGATTAA	Éxon 6	Éxon 5

Fonte: Elaboração Própria.

Os estoques bacterianos foram cultivados para posterior extração e purificação do DNA plasmidial, seguindo o protocolo de clonagem celular da Sigma Mission. Vetores lentivirais com uma sequência aleatória de nucleotídeos (*scramble*) foram utilizados para a geração de controles, o qual sofreu as mesmas condições de manipulação das sequências de *shRNA*. Os vetores de *shRNA* foram co-transfectados com plasmídeos de empacotamento lentiviral em células HEK293T, de acordo com as instruções do fabricante. Os vetores geram partículas virais inativas secretadas nesse meio de cultura, após isso foi realizado a transdução em linhagens celulares de interesse pela infecção com título viral do vetor utilizado. Sendo essas células selecionadas, utilizando antibiótico de puromicina (Sigma-Aldrich, USA). Após isso, validamos o gene *PRDX2* manipulado, realizando o experimento de Western blotting e RT-PCR com o lisado de proteínas/ e RNA das células infectadas com sequências de shRNA PRDX2. Nesse trabalho identificamos a linhagem de origem SKMEL-173 não manipulada como naive, as células *knockdown* (inibidas) foram identificadas como *scramble* para o controle (CN), PRDX2-1 para a linhagem infectada com sequência 1 de shRNA PRDX2, PRDX2-2 para a linhagem infectada com sequência 2 de shRNA PRDX2, e PRDX2-3 para a linhagem infectada com sequência 3 de shRNA PRDX2 (Tabela 4).

## Reconstrução de pele humana contendo melanoma

O modelo de pele humana reconstruída (PHR) seguiu o protocolo descrito por Brohem e

colaboradores ((BROHEM et al., 2011), com as seguintes alterações referentes ao número de células. O compartimento dérmico foi preparado utilizando matriz de colágeno-tipo I (Corning, Tewksbury, MA) com  $15 \times 10^4$  células/pele de fibroblastos humanos normais. Após a polimerização dessa matriz dérmica, foram semeados queratinócitos humanos normais ( $25 \times 10^4$  células/pele), melanócitos ( $0,83 \times 10^4$  células/pele) (na proporção de 1:30) e células de melanoma ( $50 \times 10^4$  células/pele). A quantidade de todas as células de melanoma foi mais elevada para mimetizar o processo tumoral.

As PHR foram cultivadas e incubadas submersas em meio RAFT:KGM-Gold Bullet Kit (1:1) por 24h seguidas de 11 dias de exposição a interface ar-líquido para promover a diferenciação epitelial. Após esse período, as peles foram retiradas e fixadas com paraformaldeído 4%. Após 1 hora o paraformaldeído foi retirado e adicionado em álcool 70%. O molde foi colocado no cassete histológico para o processamento.

#### Ensaio da Avaliação de histologia e imunohistoquímica em PHR

Histologia e Imuno-histoquímica: As amostras foram lavadas com PBS e fixadas por imersão em formol neutro tamponado a 10% (v/v) por 4h a 4°C. Posteriormente, foram desidratados (por etanol e xileno) e incluídos em parafina. Os cortes histológicos com 5µm de espessura foram obtidos com um micrótomo rotativo semimotorizado Leica RM2245 (Leica Biosystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA). As lâminas foram desparafinizadas e hidratadas, mergulhadas em xilol, etanol (concentração de 100%, 95%, 80%, 70% e 50%) e enxaguadas em água. Em seguida, os cortes estavam prontos para tratamento histológico ou imunohistoquímico. Para a análise histológica, os cortes hidratados foram submetidos à coloração com hematoxilina-eosina (H&E). Para análise imunohistoquímica, a recuperação antigênica foi realizada duas vezes em tampão Tris/EDTA, pH 9 por 5 min a 95 °C. O ensaio de imunomarcção foi realizado utilizando anticorpo anti-melanA (ab51061) em diluição 1:50 e Anti-E-caderina (ab1416) em diluição 1:50. Um kit comercial com anticorpo secundário de cabra contra imunoglobulinas de coelho e camundongo (EnVision Flex/HRP, Dako Omnis, Santa Clara, CA, EUA) foi usado em combinação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; EnVision Flex DAB + Chromogen, Dako Omnis, Santa Clara, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as imagens foram observadas e fotografadas com uma câmera Eclipse i80-Nikon usando o programa NIS-Elements Viewer (Nikon), para aquisição de imagens (Camarena, 2020).

### Análises estatísticas

Para a análise estatística utilizou-se o programa *GraphPad Prism 7.0*. Considerando o teste *t Student* para a comparação entre dois grupos. Para aqueles em que houver mais de dois grupos de comparação com uma variável independente, é realizado o teste *One-way Anova*, seguido pelo teste comparativo de *Tukey* ou o teste *Two-way Anova* para comparação de duas variáveis independentes. A equação de crescimento exponencial utilizou a regressão linear. As correlações de matriz entre genes foram realizadas após a normalização dos dados representado por mapas de calor (*heatmap*) e medição da relação de dependência (r Pearson). As análises foram consideradas significativas quando os valores de  $p \leq 0,05$ . Os valores foram indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes.

### Análises de bioinformática

Os dados transcritos e clínicos da coorte de Melanoma de Leeds estão acessíveis no European Genome Phenome Archive com o número de acesso EGAS00001002922 (Nsengimana et al 2018). Este é um dos maiores conjuntos de dados transcriptômicos em melanoma primário em todo o mundo, com tamanho amostral de 703 pacientes e longo acompanhamento ( $>10$  anos). Para validar/replicar nossas descobertas, realizamos as seguintes análises nesta coorte:

- A associação entre *PRDX2* e alvos relacionados a progressão tumoral foram realizados por regressão linear em toda a coorte e estratificando na mutação oncogênica. Os coeficientes beta dessas análises foram representados com *heatmap*;
- Testamos a associação entre a expressão de *PRDX2* com a presença de mutações oncogênicas *BRAF*, *NRAS* ou duplo selvagem usando a análise de variância (ANOVA);
- A correlação de Pearson foi calculada entre a expressão de *PRDX2* e a espessura de Breslow transformada em log (a transformação permitiu alcançar uma distribuição de normalidade aproximada);
- Uma análise semelhante foi realizada para testar a associação com o estadiamento do tumor (AJCC, American Joint Committee on Cancer) e os resultados foram representados graficamente como violin plots ou box plots;
- Testamos o efeito de *PRDX2* na sobrevida específica de melanoma (usando apenas mortes confirmadas como causadas por melanoma) usando a regressão de riscos proporcionais de Cox. Os perfis de sobrevida foram representados com curvas de

Kaplan-Meier. A análise de sobrevida foi realizada após da divisão da expressão de PRDX2 em 5 grupos (20% inferior = 1º quintil, 20% superior = 5º quintil). O número de 5 foi escolhido de forma arbitrária, mas é possível mesclar os grupos semelhantes. Os 4 primeiros quantis (80% com alta expressão de PRDX2) foram agrupadas por serem estatisticamente idênticas, enquanto os 20% com menos expressão de PRDX2 apresentou um prognóstico pior.

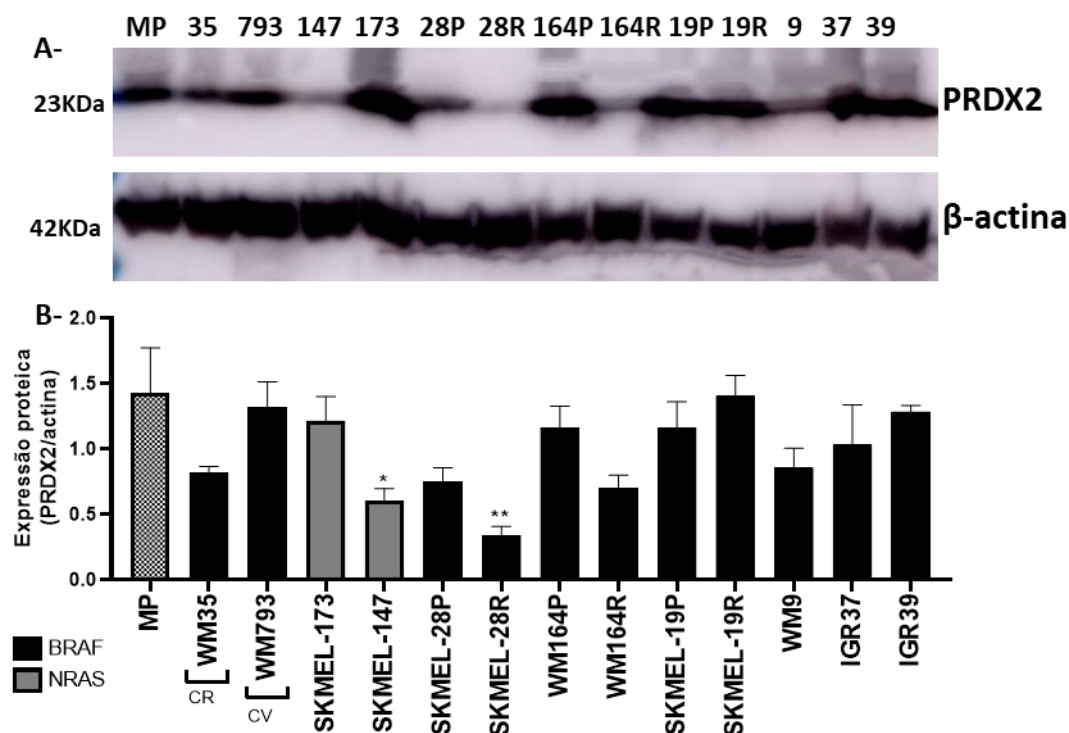
## **RESULTADOS**

Identificação do padrão de PRDX2 comparado com perfil fenotípico em linhagens de melanoma com mutação em NRAS

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que pacientes com metástase apresentavam menor expressão de PRDX2 (CARVALHO et al., 2022), por isso foi avaliada a expressão proteica de PRDX2 com todas as linhagens celulares de melanoma, disponíveis no Laboratório de Fisiopatologia da Pele. Esse resultado demonstrou que, dentre todas as linhagens celulares testadas, somente as linhagens SKMEL-147 e SKMEL-28R apresentaram diminuições significativas comparadas ao controle (melanócito), com  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente (Figura 17).



Figura 17. Expressão proteica de PRDX2 em linhagens celulares de melanoma

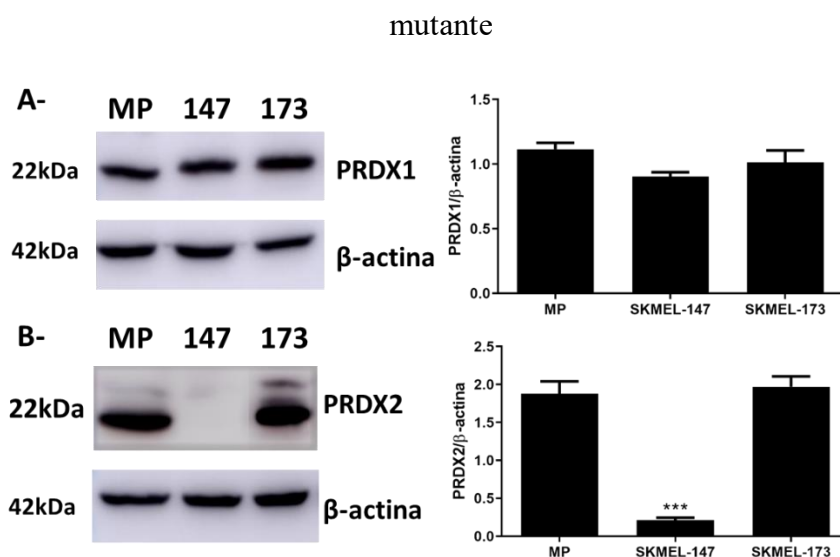


A- Análise de Western blotting para PRDX2, e B- Semiquantificação da proteína PRDX2. Linhagens celulares de melanoma disponíveis no banco do Laboratório de Fisiopatologia da pele, incluindo melanoma de crescimento radial (CR), melanoma de crescimento vertical (CV), melanoma com mutação em NRAS e melanoma com mutação em BRAF. Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle melanócito (MP).

Fonte: Elaboração Própria.

Nos chamou a atenção o fato da expressão da PRDX2 estar diminuída na SKMEL-147 e elevada na SKMEL-173, sendo que ambas possuem mutação em NRAS (Figura 18). Ao mesmo tempo, não houve diferença de expressão para PRDX1 nessas linhagens NRAS.

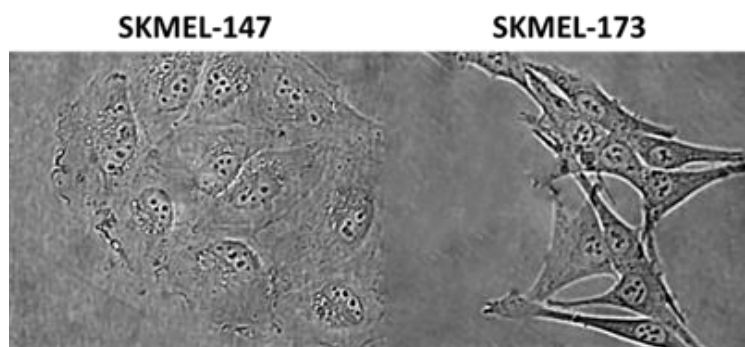
Figura 18. Expressão proteica de PRDX1 e PRDX2 em linhagens de melanoma NRAS



A- Expressão proteica por WB de PRDX1, e B- Expressão proteica por WB de PRDX2 em linhagens de melanoma NRAS mutante. Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle melanócito (MP).  
Fonte: Elaboração Própria.

Inicialmente, observamos que estas células apresentam morfologias completamente distintas, sendo a SKMEL-147 mais arredondada e a SKMEL-173 mais alongada (Figura 19). Em seguida, investigamos diferenças funcionais entre elas.

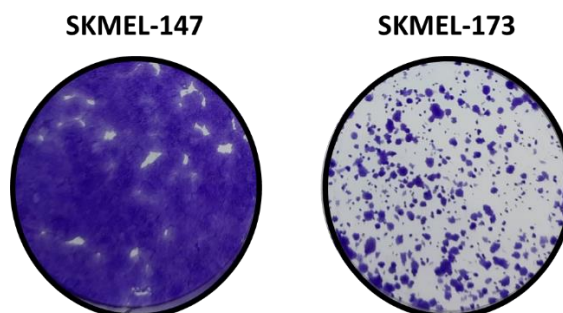
Figura 19. Fotomicrografia das linhagens celulares com mutação em NRAS



Linhagens NRAS: SK-MEL-147 e SK-MEL-173, no objetiva de 40x.  
Fonte: Elaboração Própria.

O ensaio de clonogênico após 15 dias mostrou diferença na característica da formação de colônias, provavelmente devido a morfologia da SKMEL-147 apresentar células maiores e mais arredondadas, do mesmo modo as colônias apresentaram a forma mais achatada e com maior espalhamento no poço (Figura 20).

Figura 20. Característica das colônias formadas pelas linhagens de melanoma NRAS mutantes

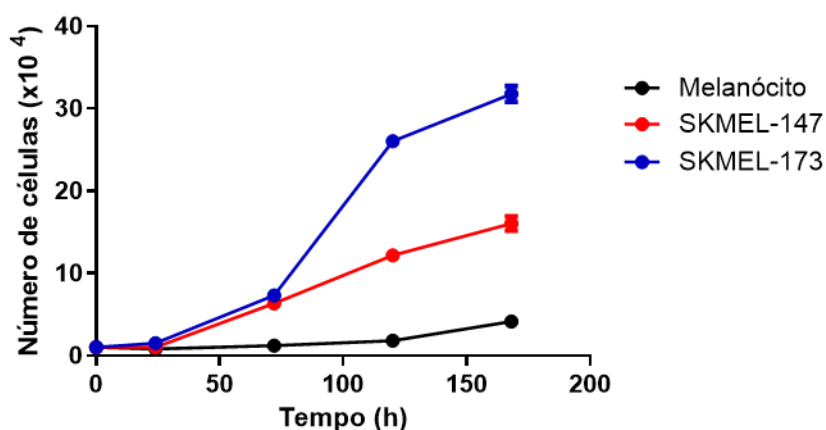


Figuras representativas de resultados em duplicata de três experimentos independentes. Cultivo de 1000 células por poço após 15 dias.

Fonte: Elaboração Própria.

O primeiro ensaio funcional realizado foi a curva de crescimento acompanhado em diferentes tempos (24, 72, 120 e 168 horas), mostrando que a célula-controle (MP) teve o maior tempo de dobramento de 109 horas, a SKMEL-147 com 36 horas e a SKMEL-173 com 25 horas. Ou seja: a SKMEL-173 se prolifera de forma mais rápida comparada às outras, o que já indica um maior potencial proliferativo (Figura 21).

Figura 21. Curva de crescimento das linhagens de melanoma NRAS mutante com tempos de proliferação diferentes



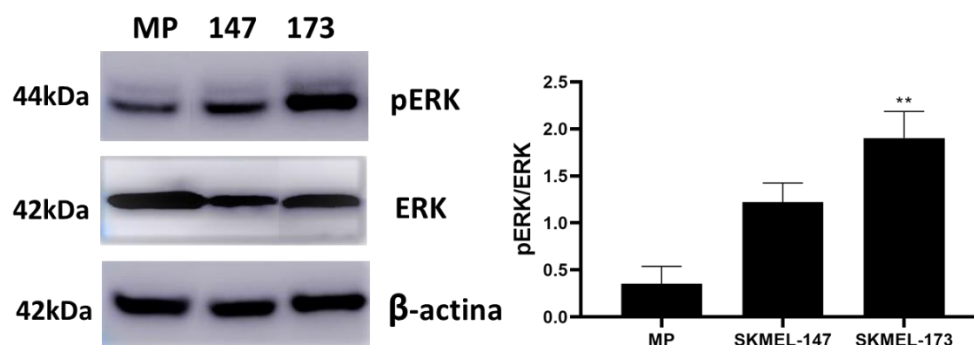
Tempo de dobramento	MP	147	173
Horas	109,2	36,30	25,56

Foram semeadas  $1 \times 10^4$  cél/poço e as células foram contadas nos tempos 24, 72, 120 e 168h, excluindo-se as mortas por azul de tripan. Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. Siglas: MP- melanócito; 147- SKMEL-147 e 173- SKMEL-173.

Fonte: Elaboração Própria.

Como a via de ERK é a principal via responsável pelo crescimento tumoral e proliferação celular no melanoma, verificamos a ativação dessa via pela fosforilação de ERK. A expressão da fosforilação de ERK foi maior na SKMEL-173, confirmando seu maior potencial proliferativo se comparada à SKMEL-147 e ao melanócito (Figura 22).

Figura 22. Expressão da proteína ERK fosforilada em linhagens de melanoma NRAS mutante

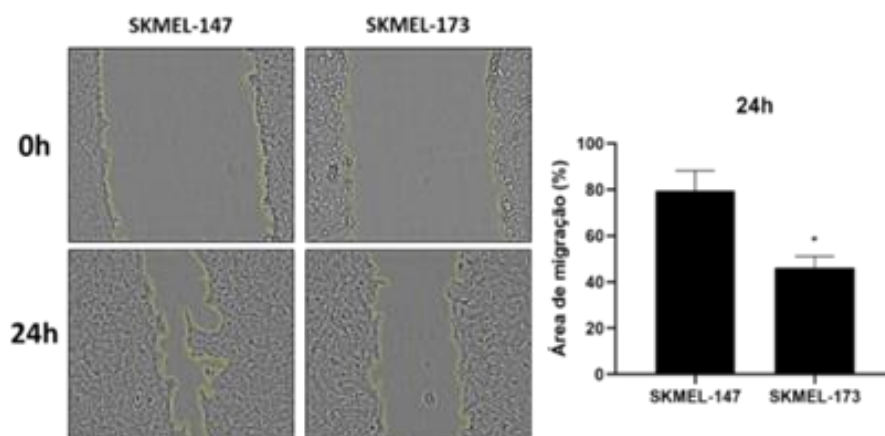


Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle melanócito (MP).

Fonte: Elaboração Própria.

O ensaio da “ferida” foi realizado para avaliar o potencial de migração dessas células de melanoma NRAS mutante e, oposto aos resultados de proliferação, a SKMEL-147 foi a linhagem com maior migração da ferida após 24 horas, quando comparada à SKMEL-173 (Figura 23).

Figura 23. Ensaio de migração das linhagens de melanoma NRAS mutante

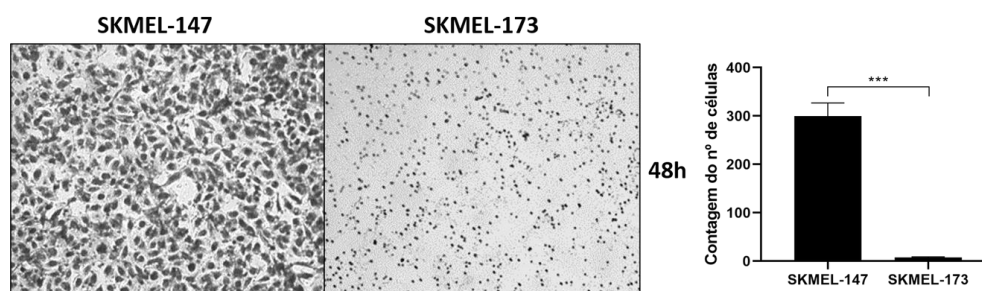


Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de T-student, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ .

Fonte: Elaboração Própria.

Também realizamos o ensaio de invasão, confirmando que a SKMEL-147, além de ser mais migratória, é mais invasiva, quando comparada à SKMEL-173. Na figura 24 mostra as células que foram capazes de invadir o inserto com a matrigel.

Figura 24. Ensaio de invasão celular comparando as linhagens de melanoma NRAS mutante

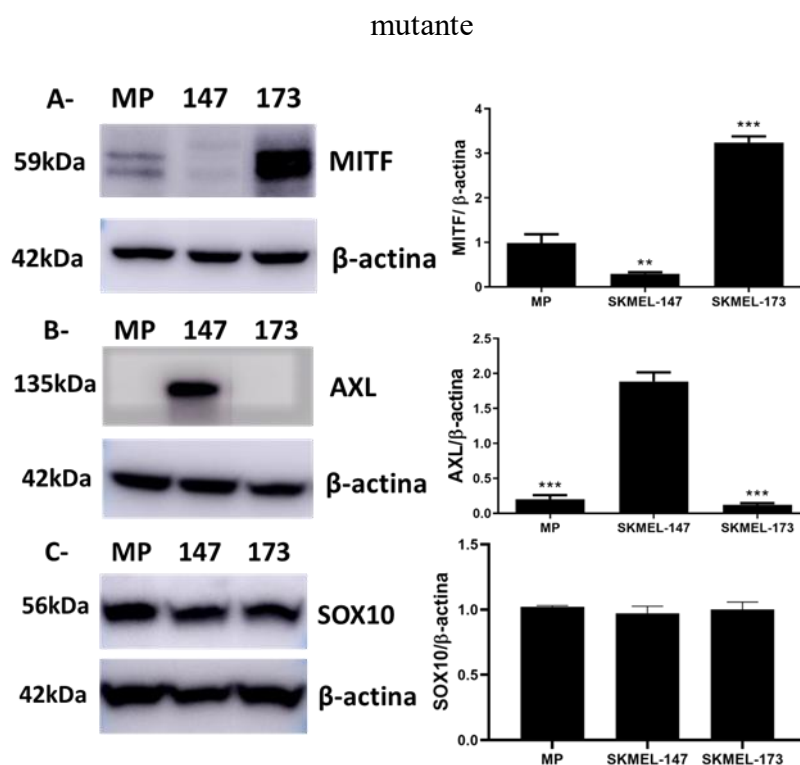


Semiquantificação no número de células que invadiram a membrana. A análise estatística foi feita por análise de T-student, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes.

Fonte: Elaboração Própria.

Considerando as diferenças funcionais, morfológicas e de expressão da PRDX2, decidimos avaliar a expressão de proteínas importantes envolvidas nas vias de proliferação e invasão do melanoma. Avaliamos as expressões de proteínas MITF, AXL e SOX10 nas linhagens NRAS, comparadas ao MP. A linhagem SKMEL-173 apresentou alta expressão de MITF e baixa de AXL, e a SKMEL-147 o perfil oposto, com baixa expressão de MITF e alta de AXL. Somente a SOX10 não apresentou diferença entre as linhagens comparadas ( $p < 0,001$ ) (Figura 25).

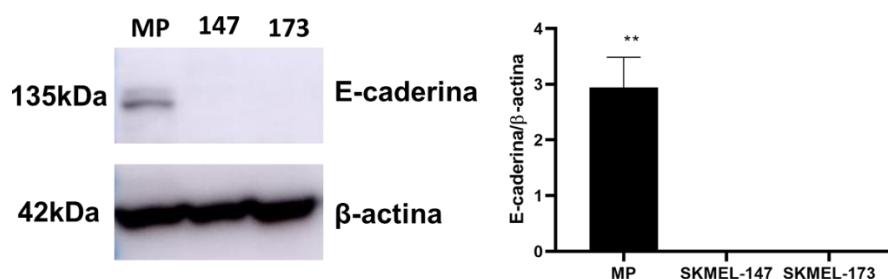
Figura 25. Expressão proteica de MITF, AXL e SOX10 em linhagens de melanoma NRAS



A- Expressão proteica de MITF, B- Expressão proteica de AXL e C- Expressão proteica de SOX10 em linhagens de melanoma NRAS mutante. Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle de melanócito (MP).  
Fonte: Elaboração Própria.

A proteína E-caderina é capaz de estabilizar as junções aderentes celulares, importantes para o processo de invasão. Por isso, analisamos sua expressão proteica em linhagens de melanoma NRAS mutante e controle (MP). Verificamos que somente o melanócito apresentou a expressão dessa proteína, enquanto não houve nenhuma expressão no melanoma (Figura 26).

Figura 26. Expressão proteica de E-caderina em linhagens de melanoma NRAS mutante

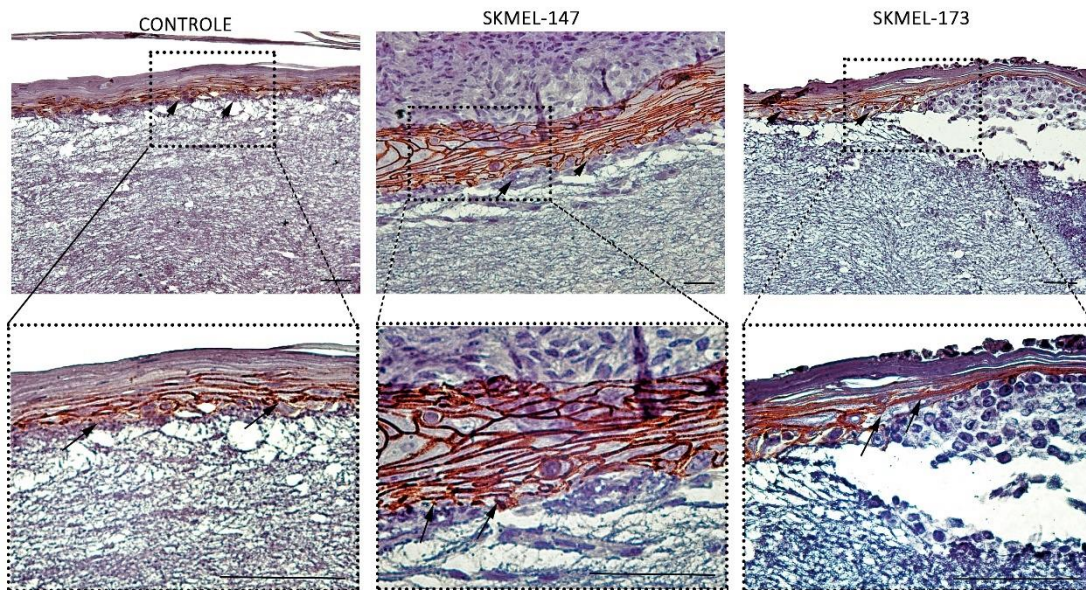


Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle (melanócito - MP).  
Fonte: Elaboração Própria.



O ensaio de imuno-histoquímica confirma a expressão de E-caderina, evidenciada também por WB. Observou-se a presença do E-caderina somente na camada da epiderme na região suprabasal da pele reconstruída (onde se encontram os queratinócitos e melanócitos diferenciados). Por outro lado, a marcação desse anticorpo (E-caderina) não foi observada em células de melanoma (Figura 27). Podemos observar com base nesses dados, que essas linhagens de melanoma NRAS mutante não expressam E-caderina.

Figura 27. Imuno-histoquímica de e-caderina em peles humanas reconstruídas com melanoma NRAS mutante



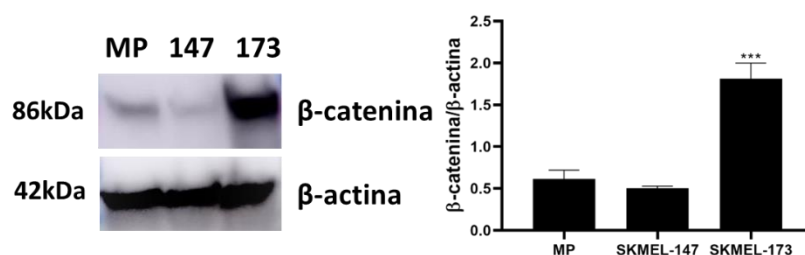
Imuno-histoquímica das peles humanas reconstruídas (PHR) controle sem melanoma e com melanoma NRAS mutante (SKMEL-147 e SKMEL-173) para E-caderina em aumento de 200x e 400x.

As setas indicam os locais de marcação do anticorpo E-caderina.

Fonte: Elaboração Própria.

A proteína  $\beta$ -catenina também está relacionada com a estabilização de junções aderentes celulares. A linhagem SKMEL-147 apresenta baixa expressão de  $\beta$ -catenina, enquanto a SKMEL-173 tem alta expressão de  $\beta$ -catenina, o que concorda com seu perfil proliferativo (Figura 28). Isso ocorre devido a sinalização canônica de WNT que previne a degradação de  $\beta$ -catenina e leva à sua estabilização no citosol, e associação com fatores de transcrição (TEIXIDO et al., 2021), que coopera com a sinalização de MAPK para regular a atividade de MITF, em células de melanoma proliferativas (WEBSTER; KUGEL; WEERARATNA, 2015).

Figura 28. Expressão proteica de  $\beta$ -catenina em linhagens de melanoma NRAS mutante

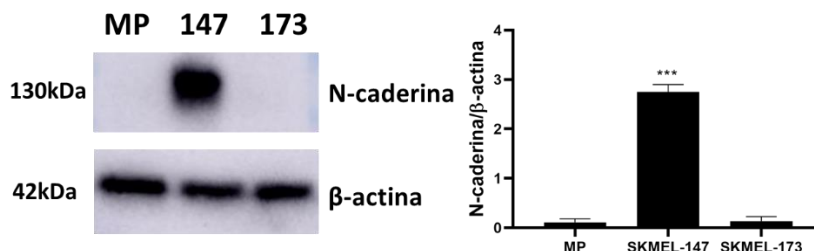


Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle (melanócito - MP).

Fonte: Elaboração Própria.

A expressão de N-caderina foi analisada por ser um biomarcador na EMT. A linhagem SKMEL-147 apresenta alta expressão de N-caderina, concordando com o seu perfil invasivo, sendo o oposto verificado na SKMEL-173 e MP (Figura 29).

Figura 29. Expressão proteica de N-caderina em linhagens de melanoma NRAS mutante



Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle (melanócito - MP).

Fonte: Elaboração Própria.

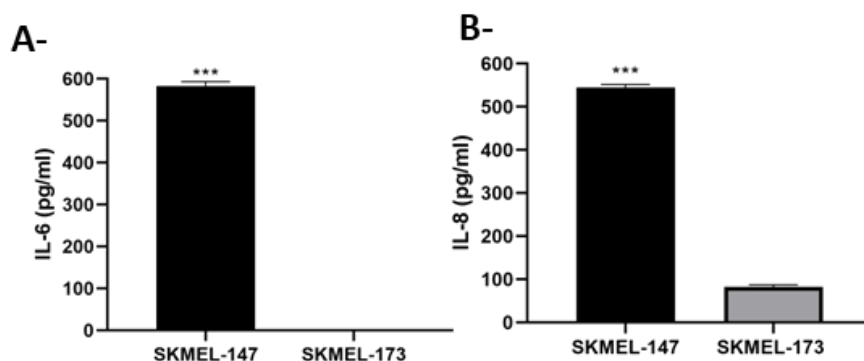
As metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) tem papel fundamental na degradação da matriz extracelular favorecendo a disseminação do melanoma para sítios metastáticos (NAPOLI et al., 2020), porém não tiveram nenhuma detecção de secreção nas linhagens de melanoma NRAS mutantes. Sendo assim, poderia estar relacionado a outras citocinas.

Sabe-se que as interleucinas são importantes citocinas pró-inflamatórias associadas à progressão do câncer e formação de metástases. Como esses fatores solúveis estão relacionados com o potencial invasivo, seria interessante correlacioná-las com as linhagens estudadas. Por isso foi feita a dosagem de interleucinas de linhagens de melanoma NRAS mutante, mostrando



que tanto a interleucina-6 quanto a interleucina-8 foram mais secretadas pela linhagem SKMEL-147, quando comparada à SKMEL-173 ( $p < 0,001$ ) (Figura 30).

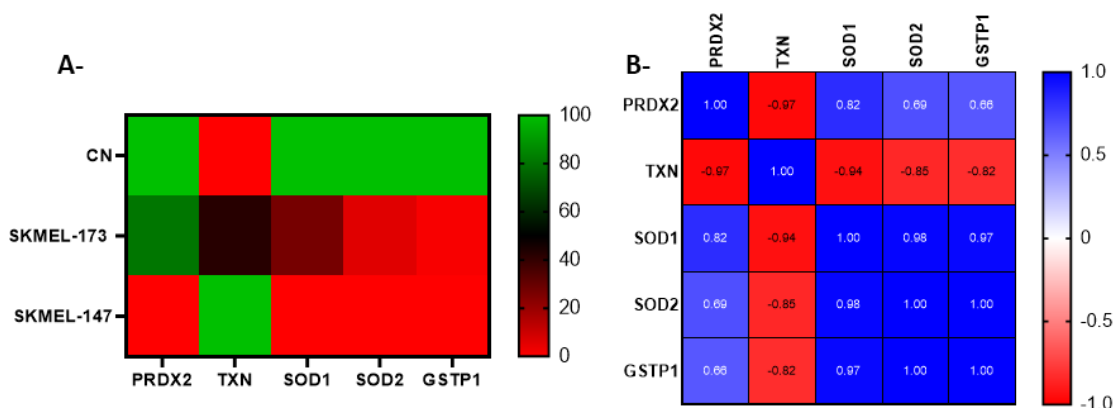
Figura 30. Dosagem de citocinas IL-6 e IL-8 em linhagens de melanoma NRAS mutante



Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de T-student, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ .  
Fonte: Elaboração Própria.

Visto a diferença entre as linhagens NRAS, ainda faltaria avaliar se essa diferença poderia estar associada a alguma outra enzima antioxidante, ou, principalmente, se a PRDX2 estaria alterada. Desse modo, verificamos a expressão de genes de proteínas antioxidantes em linhagens NRAS e melanócito. Observamos que *SOD1*, *2* e *GSTP1* estão pouco expressos em ambas as linhagens NRAS se comparado ao melanócito. A expressão gênica de *PRDX2* corrobora os nossos dados vistos anteriormente por WB, com maior expressão nos melanócitos e SKMEL-173 se comparada à SKMEL-147. Entretanto, a *TXN* (tioredoxina) estava aumentada na SKMEL-147, com uma correlação inversa com a *PRDX2* (Figura 31).

Figura 31. Expressão de genes antioxidantes correlacionados com as linhagens NRAS

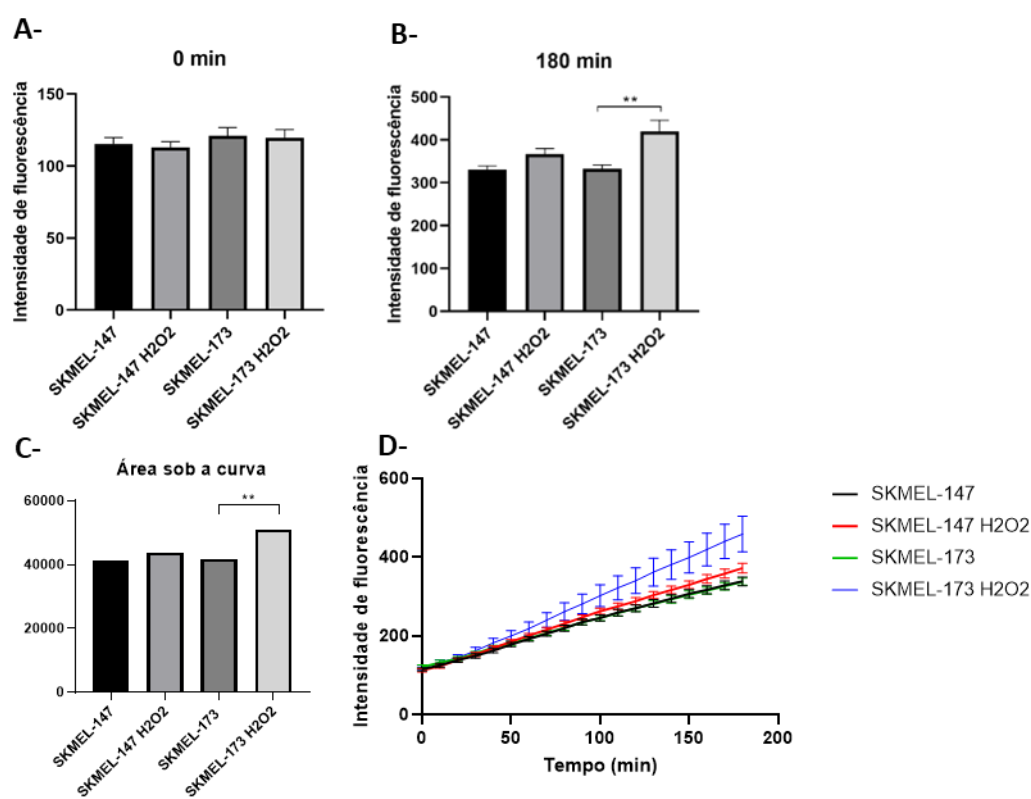


A-Expressão de genes normalizados que codificam proteínas antioxidantes relacionados ao câncer com as linhagens de melanoma NRAS mutante (CN- melanócito, SKMEL-173, SKMEL-147) por RT-PCR e B-Correlação de Pearson da expressão dos genes testados por RT-PCR. Resultados em triplicata de três experimentos

independentes.  
Fonte: Elaboração Própria.

Supomos que a falta de PRDX2 alteraria a produção de ROS, portanto realizamos o ensaio de DHR para analisar a produção de espécies reativas de oxigênio pela oxidação da di-hidrorodamina 123 (DHR). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado como controle positivo, pois aumentaria o estresse oxidativo. Embora a SKMEL-147 não tenha produzido ROS, isso poderia ser explicado por mecanismos compensatórios como a alta expressão de TXN atuando na manutenção redox. Apesar disso, quando comparamos os níveis basais de ROS das células não tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não há diferença entre as linhagens NRAS (Figura 32).

Figura 32. Avaliação cinética da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem de melanoma NRAS mutante após 3 horas



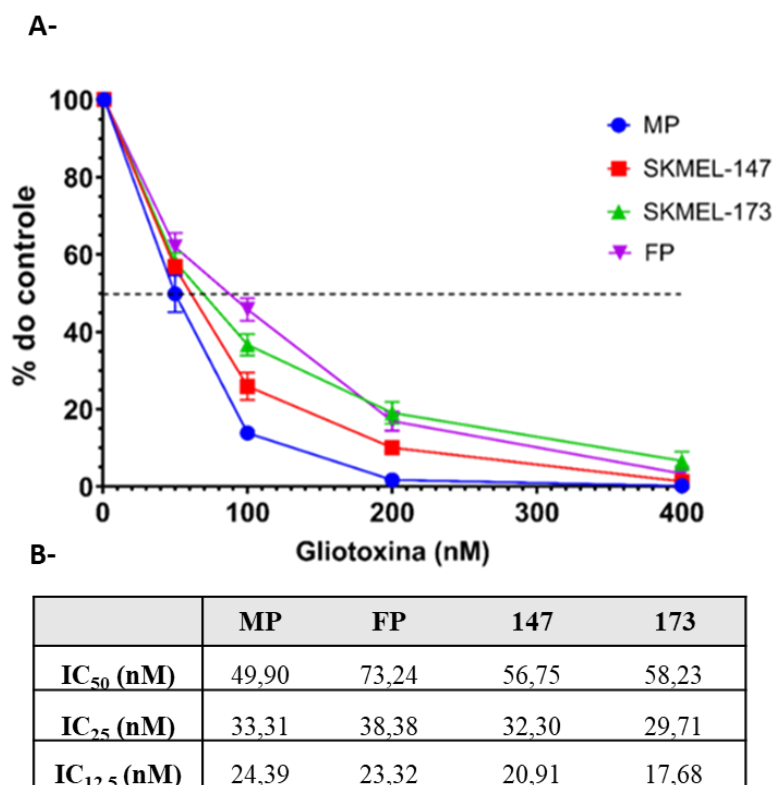
A- Geração de ROS no tempo 0, B- Geração de ROS no tempo final de 3 horas, C- Área sob a curva de ROS após 3 horas e D- Avaliação cinética da geração de ROS. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM) como controle positivo de produção de ROS. Os valores estão indicados por média ± erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. Foi considerado significativo quando \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001.  
Fonte: Elaboração Própria.

Tratamento com gliotoxina como mimético de PRDX2

Em busca de restaurar o papel da PRDX2 no melanoma, testamos a gliotoxina (GT), um

composto mimético ao PRDX2. O teste de viabilidade foi realizado para verificar a citotoxicidade das linhagens testadas em relação à GT. Os resultados da concentração inibitória de 50% das células foram de 49,9 nM para os melanócitos, 56,75 nM para SKMEL-147, 58,25 nM para SKMEL-173 e 73,24 nM para os fibroblastos. Os resultados demonstraram que não há diferença de sensibilidade ao composto entre as linhagens de melanoma NRAS mutante, e este composto não é seletivo, devido à similaridade na concentração inibitória entre as linhagens de melanoma com as células controle (Figura 33).

Figura 33. Teste de viabilidade nas linhagens de melanoma NRAS mutante, fibroblastos (FP) e melanócitos (MP)

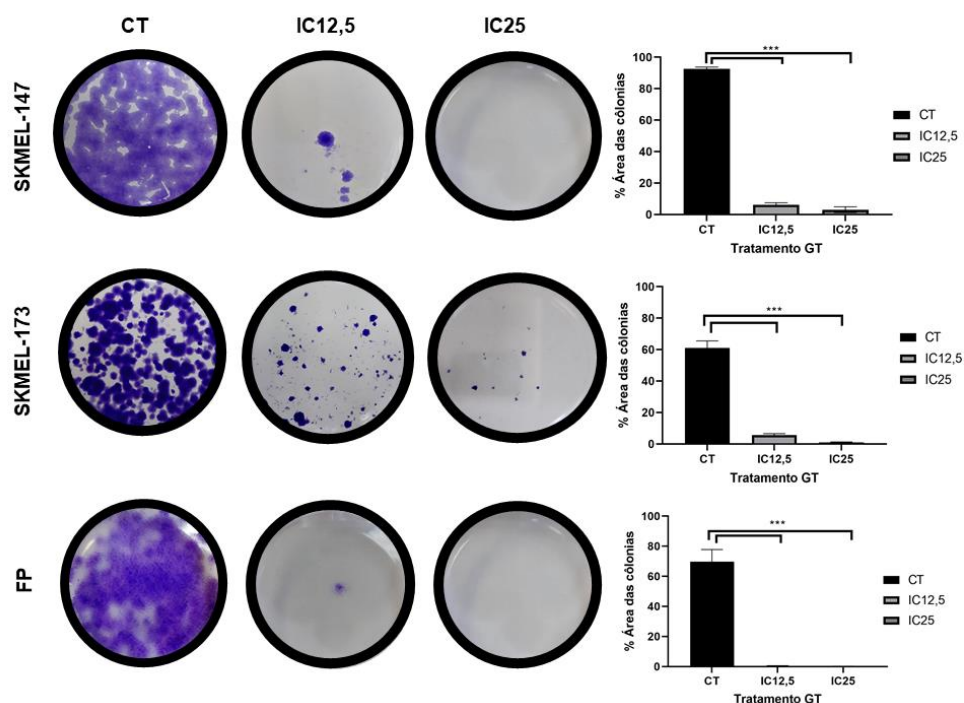


A- Curva de viabilidade e B- Tabela com os valores calculados de IC<sub>50</sub>, IC<sub>25</sub> e IC<sub>12,5</sub>. Foram semeadas  $2 \times 10^4$  cél/poço e as células foram contadas após tratamento com GT em 24h, excluindo as células mortas por azul de tripan. Não houve controle com DMSO, pois a quantidade de DMSO utilizada nos tratamentos é  $>0,01\%$ , sendo uma quantidade irrisória. Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes.

Fonte: Elaboração Própria.

O composto também tem ação na inibição de formação de colônias após 15 dias de tratamento em baixas doses de IC<sub>25</sub> e IC<sub>12,5</sub> sem diferença entre as linhagens (Figura 34). Esses resultados demonstram a potencial ação citotóxica e/ou ação antiproliferativa em doses baixas (nM) de GT.

Figura 34. Teste de sensibilidade a gliotoxina nas linhagens de melanoma NRAS mutante e fibroblastos (FP) quanto a formação de colônias comparada com o controle não tratado, utilizando a concentração do IC<sub>25</sub> e IC<sub>12,5</sub>



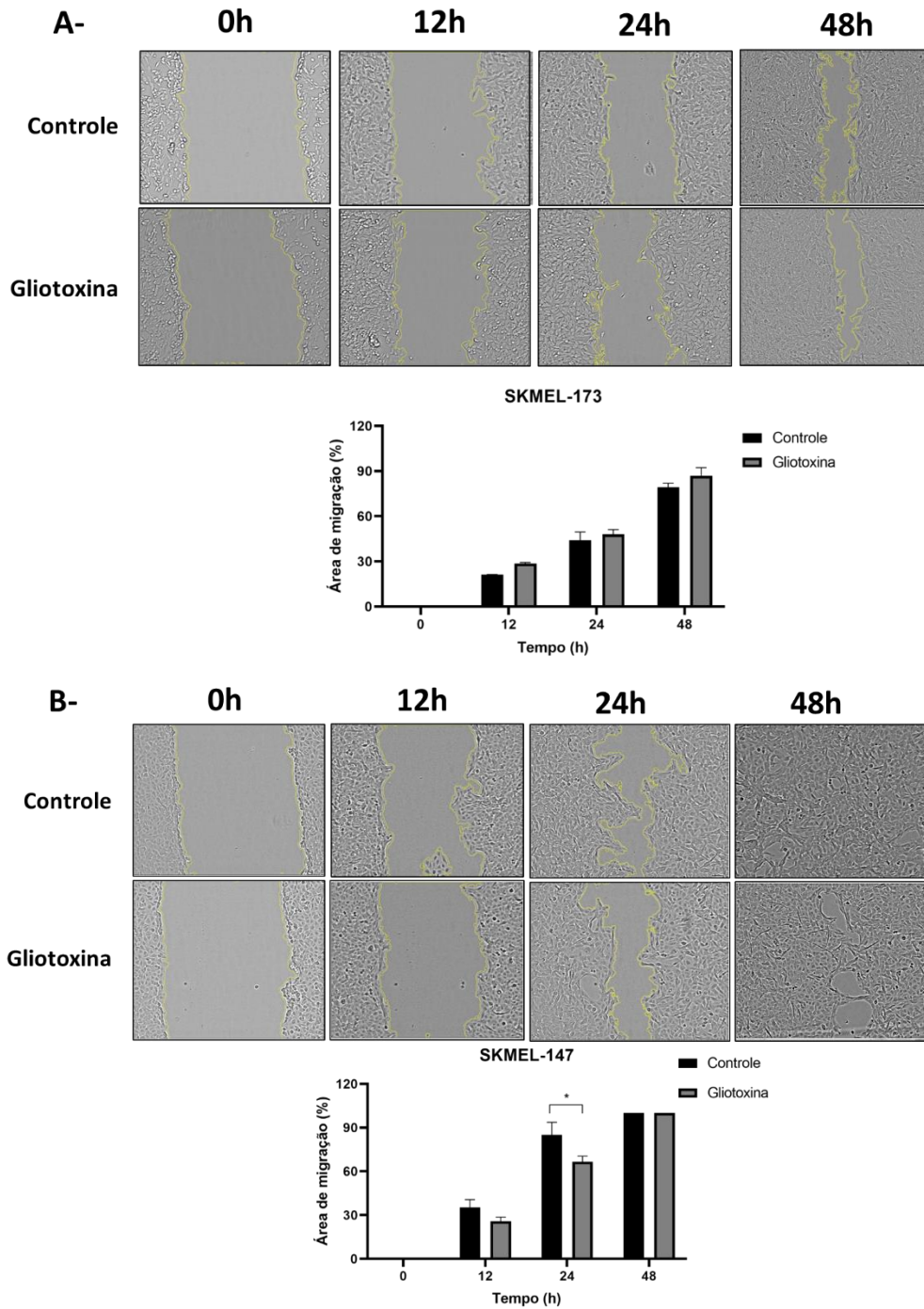
Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em duplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ .

Fonte: Elaboração Própria.

O ensaio de migração celular mostrou que somente a linhagem SKMEL-147 foi capaz de manter a área da ferida após o tratamento com GT quando comparado ao controle não tratado, o qual fechou completamente a ferida. Na linhagem SKMEL-173, por outro lado, não houve diferença na migração após o tratamento por 24 horas (Figura 35). Somente a linhagem com ausência basal de PRDX2 (SKMEL-147) respondeu ao mimético de PRDX2.

Figura 35. Ensaio de migração celular em linhagens de melanoma NRAS mutante tratadas

com gliotoxina e não tratadas.



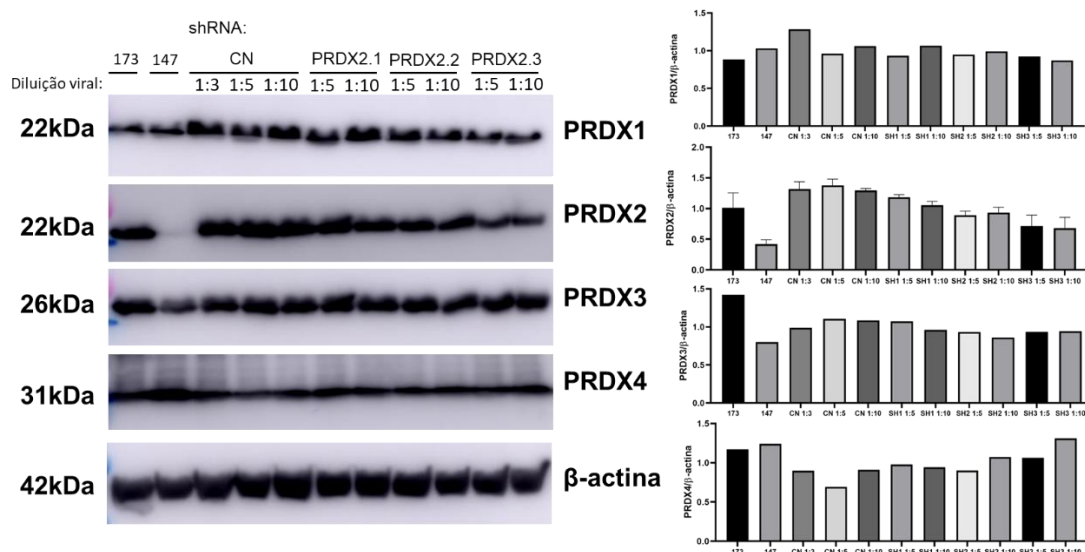
Imagens representativas e semiquantificação da área, cuja representação é de três experimentos independentes, feitos em duplicata. A- Ensaio da ferida para SKMEL-173, B- Ensaio da ferida para SKMEL-147. A análise estatística foi feita por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . IC75= 99,7nM da SKMEL-147 e IC75= 114,1nM na SKMEL 173

Fonte: Elaboração Própria.

Inibição do gene *PRDX2* por *shRNA* na linhagem de melanoma SKMEL-173 naive e mudança de perfil fenotípico

Em busca de confirmar se a expressão de *PRDX2* estaria realmente modulando o perfil fenotípico observado nas diferenças entre as linhagens de melanoma *NRAS* mutante, realizamos a inibição gênica de *PRDX2* na linhagem SKMEL-173, a qual expressa *PRDX2*. Primeiramente, selecionamos as sequências inibidoras de *PRDX2* em diferentes concentrações virais, verificando a melhor sequência e concentração capaz de inibir *PRDX2*. Posteriormente, verificamos a expressão das outras peroxirredoxinas do grupo 2-cys *PRDX* (*PRDX1*, 2, 3 e 4), confirmando a especificidade da sequência por não haver a inibição de outras isoformas de *PRDX*, somente da isoforma de interesse (*PRDX2*) (Figura 36).

Figura 36. Expressão proteica de *PRDX1*, 2, 3 e 4 em linhagens de melanoma *NRAS* mutante e linhagens infectadas com sequências de *shRNA PRDX2*



Experimento piloto. Expressão proteica por WB para expressão das proteínas do grupo 2-cys Prdx (*PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3* e *PRDX4*) nas linhagens com mutação em *NRAS* (SKMEL-147 e SKMEL-173) e linhagens editadas (*shPRDX2.1*, *PRDX2.2* e *PRDX2.3*) nas diluições virais de 1:5, 1:10 para verificar a linhagens com maior inibição proteica de *PRDX*. Controle (CN)- *scramble*.

Fonte: Elaboração Própria.

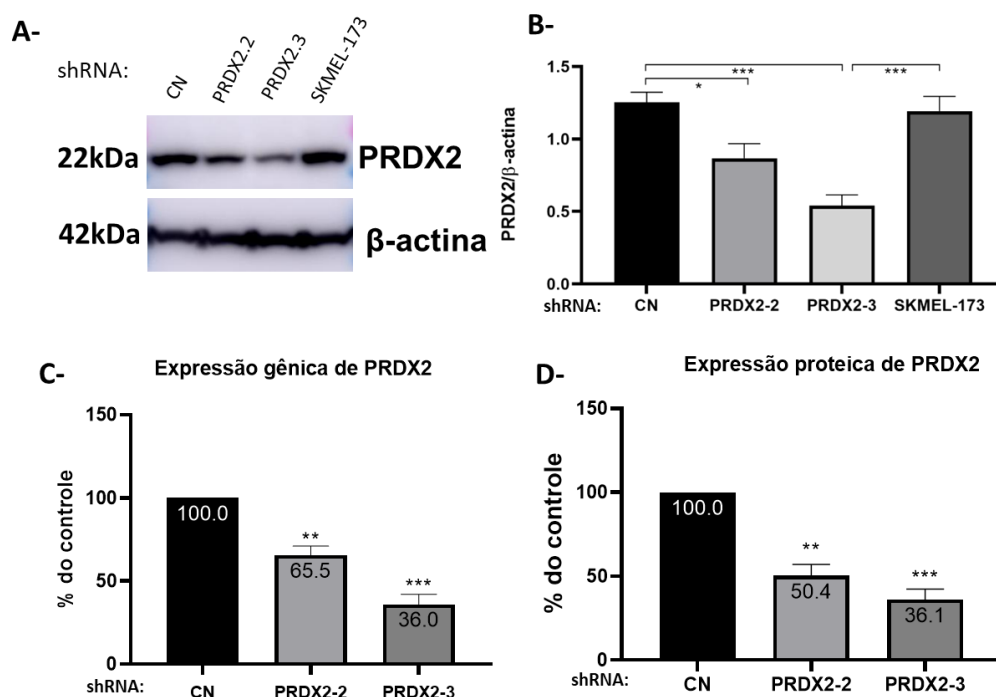
Selecionamos a titulação de 1:10 de diluição viral do *shRNA*, por sua maior inibição de *PRDX2*. A linhagem infectada com sequências de *shRNA PRDX2-1* mostrou uma diminuição não significativa em relação ao controle (*scramble*). Por esse motivo, decidimos não utilizá-la nos experimentos seguintes. Contudo, as demais sequências gênicas foram capazes de inibir a expressão proteica de *PRDX2*, como esperado. Tanto o controle (*scramble*), o qual será



utilizado para comparar todos os experimentos com as linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2, quanto a célula SKMEL-173 naive mostraram uma alta expressão de PRDX2.

Quantificamos a expressão gênica e proteica das linhagens celulares selecionadas PRDX2-2 e PRDX2-3. A expressão de gênica e proteica da peroxirredoxina 2 foi de 66% e 50% na linhagem PRDX2-2 e de 36% e 36% na linhagem PRDX2-3, respectivamente (Figura 37).

Figura 37. Expressão proteica e gênica de PRDX2 das linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2



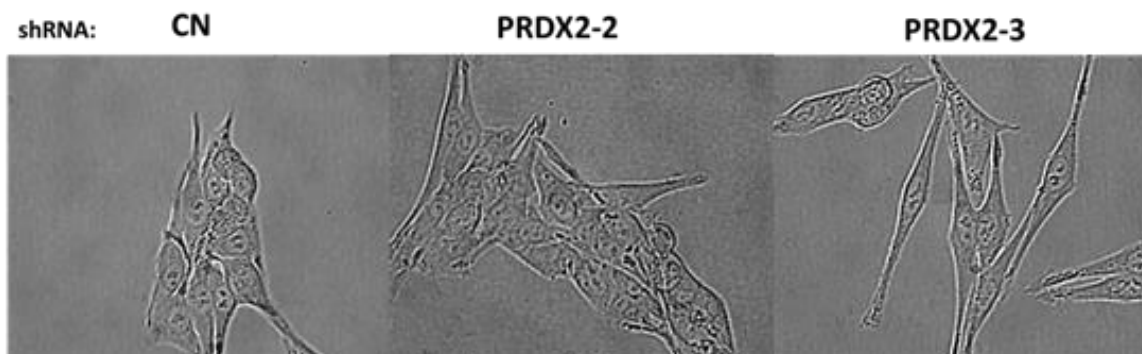
A- Expressão proteica de PRDX2 das linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2 selecionadas, de acordo com a diferença de expressão comparado com o controle (*scramble*) e com a célula de origem (SKMEL-173), B- Semiquantificação da expressão proteica, C- Porcentagem gênica de PRDX2 normalizados pelo controle (*scramble*) e D- Porcentagem proteica de PRDX2 normalizados pelo controle (*scramble*). As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ . Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes.

Fonte: Elaboração Própria.

As linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2 mantiveram a morfologia semelhante às células SKMEL-173 naive, porém a linhagem PRDX2-3 se apresentou mais afilada quando comparada às outras (Figura 38).

Figura 38. Fotomicrografia das linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA

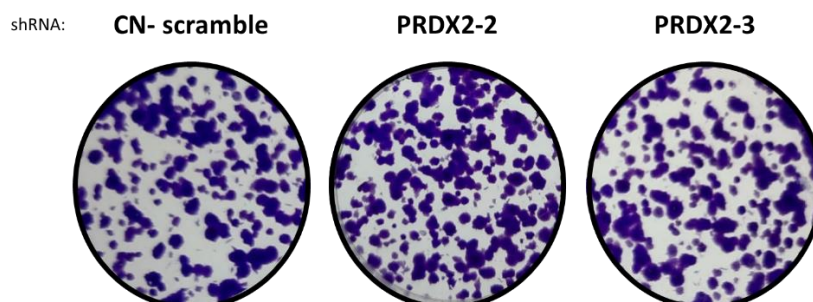
## PRDX2



Linhas: CN- *scramble*, PRDX2-2 e PRDX2-3, na objetiva de 40x.  
Fonte: Elaboração Própria.

As linhagens de melanoma infectadas com seqüências de shRNA PRDX2 não tiveram diferenças na característica das colônias formadas e sua quantidade (Figura 39).

Figura 39. Característica das colônias formadas pelas linhagens de melanoma infectadas com seqüências de shRNA PRDX2



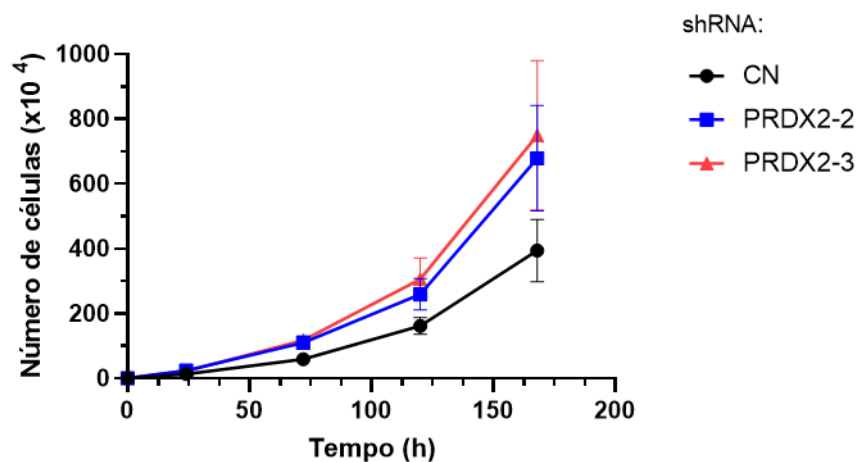
Figuras representativas de resultados em duplicata de três experimentos independentes. Cultivo de 1000 células por poço após 15 dias.  
Fonte: Elaboração Própria.

Após o *knockdown* de PRDX2 no melanoma NRAS mutante, foram realizados todos os ensaios funcionais já mostrado para as células NRAS naive. O resultado da curva de crescimento não apresentou diferença entre as linhagens infectadas com seqüências de shRNA PRDX2, com tempos de dobramentos similares e sem diferenças estatísticas, indicando que PRDX2 não altera diretamente o potencial proliferativo celular. (Figura 40).

Figura 40. Curva de crescimento das linhagens de melanoma infectadas com seqüências de



## shRNA PRDX2 com os tempos de proliferação



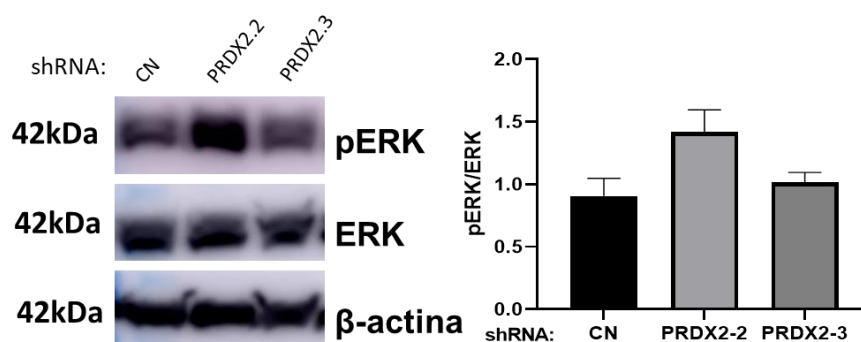
Tempo de dobramento	CN	PRDX2-2	PRDX2-3
Horas	35,10	34,21	35,07

Foram semeadas  $1 \times 10^4$  cél/poço e as células foram contadas nos tempos 24, 72, 120 e 168h, excluindo-se as mortas por azul de tripan. Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes e normalizados. CN-*scramble*.

Fonte: Elaboração Própria.

A ausência de diferenças significativas na fosforilação de ERK evidencia que não houve alteração no potencial proliferativo (Figura 41)

Figura 41. Expressão da proteína ERK fosforilada em linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2

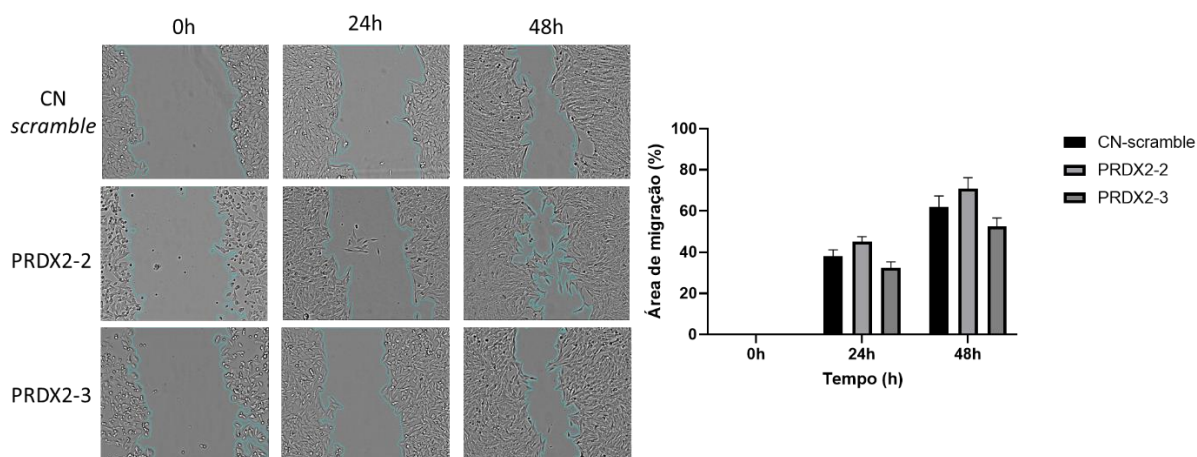


A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle (*scramble*). Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes.

Fonte: Elaboração Própria.

O ensaio de migração também não demonstrou diferenças entre as linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2 (Figura 42).

Figura 42. Ensaio de migração celular na linhagem de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2

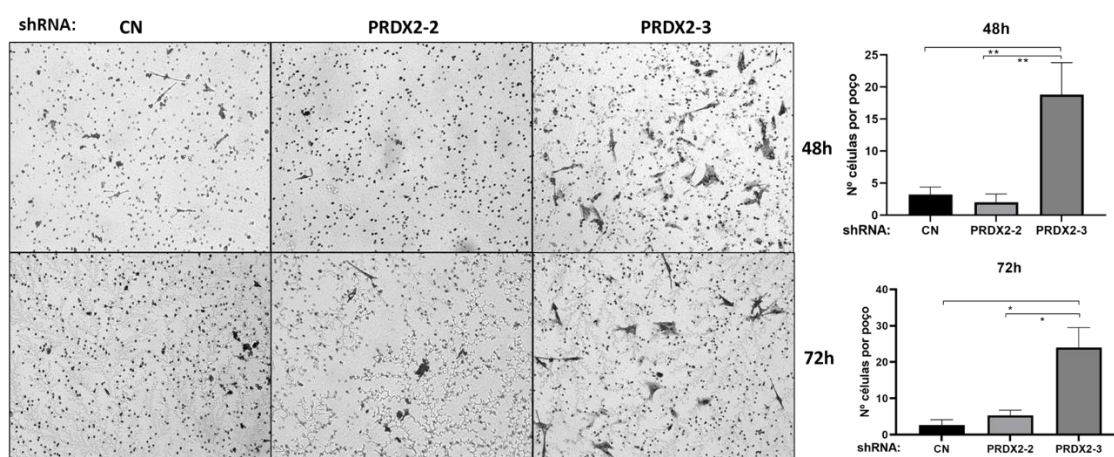


Imagens representativas e semiquantificação da área, cuja representação é de três experimentos independentes, feitos em duplicata. A análise estatística foi feita por análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ .

Fonte: Elaboração Própria.

Por outro lado, o ensaio de Transwell demonstrou mudança no potencial invasivo na linhagem PRDX2-3, que, após 48 e 72 horas, teve um aumento significativo na invasão das células quando comparada ao *scramble* (CN) (Figura 43).

Figura 43. Ensaio de invasão celular comparando as linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2

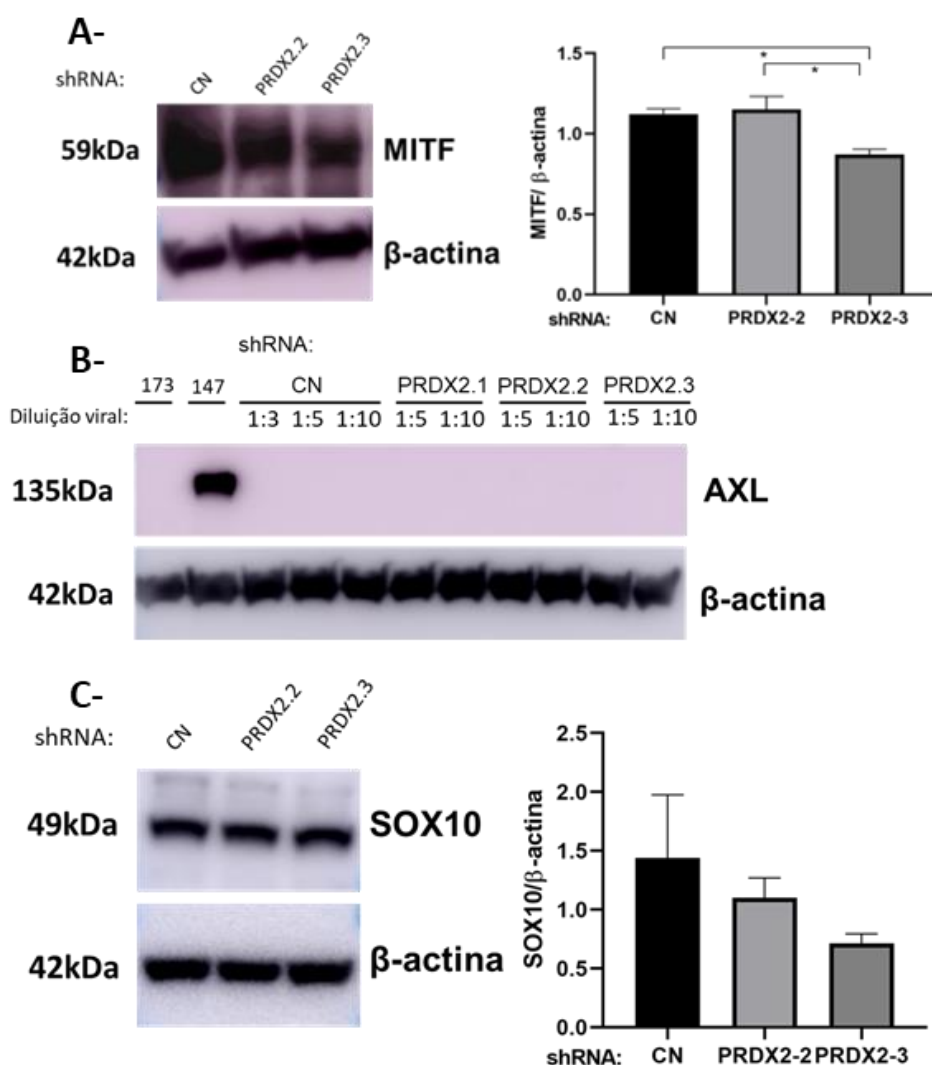


Linhagens: PRDX2-2, PRDX2-3 e *scramble* (CN). Semiquantificação no número de células que invadiram a membrana. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle (*scramble*). Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes.

Fonte: Elaboração Própria.

Em busca de proteínas importantes no potencial de invasão do melanoma, nós analisamos a expressão de MITF, AXL e SOX10. A expressão de MITF foi diminuída na linhagem PRDX2-3 ( $p < 0,05$ ), uma proteína relacionada à mudança de perfil fenotípico. A proteína AXL não foi expressa em nenhuma das linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2, como visto na SKMEL-173 naive. Da mesma forma, a SOX10 não mostrou alteração de expressão nas linhagens estudadas (Figura 44).

Figura 44. Expressão proteica de MITF, AXL e SOX10 em linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2

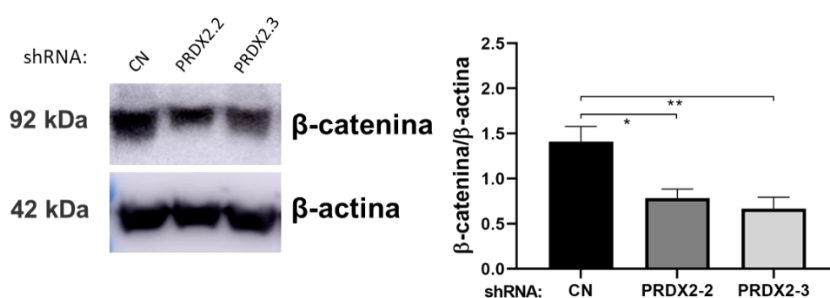


A-Expressão proteica de MITF, B- Expressão proteica de AXL e C- Expressão proteica de SOX10 em linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2 (PRDX2-2 e PRDX2-3). Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle (*scramble*).

Fonte: Elaboração Própria.

Como não houve a expressão de N-caderina na SKMEL-173 naive, as células infectadas com seqüências de shRNA PRDX2 também não apresentaram expressão. Apesar disso, a expressão de  $\beta$ -catenina foi diminuída nas linhagens infectadas com seqüências de shRNA PRDX2 (PRDX2-2 e PRDX2-3) em comparação ao CN (*scramble*) (Figura 45).

Figura 45. Expressão proteica de  $\beta$ -catenina em linhagens de melanoma infectadas com seqüências de shRNA PRDX2

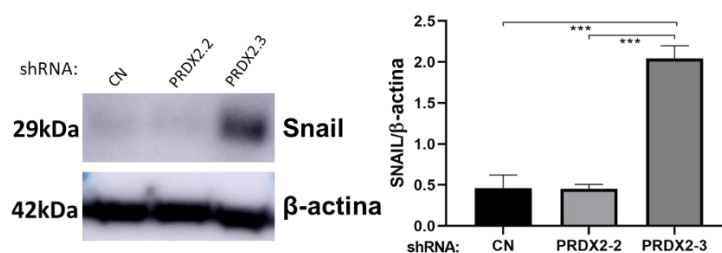


Expressão proteica de  $\beta$ -catenina em linhagens de melanoma infectadas com seqüências de shRNA PRDX2 (PRDX2-2 e PRDX2-3). Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle (*scramble*).

Fonte: Elaboração Própria.

Além disso, analisamos a expressão de SNAIL, um marcador de EMT expresso somente na linhagem PRDX2-3, sendo essa a mais invasiva quando comparada ao *scramble* (Figura 46).

Figura 46. Expressão proteica de Snail em linhagens de melanoma infectadas com seqüências de shRNA PRDX2



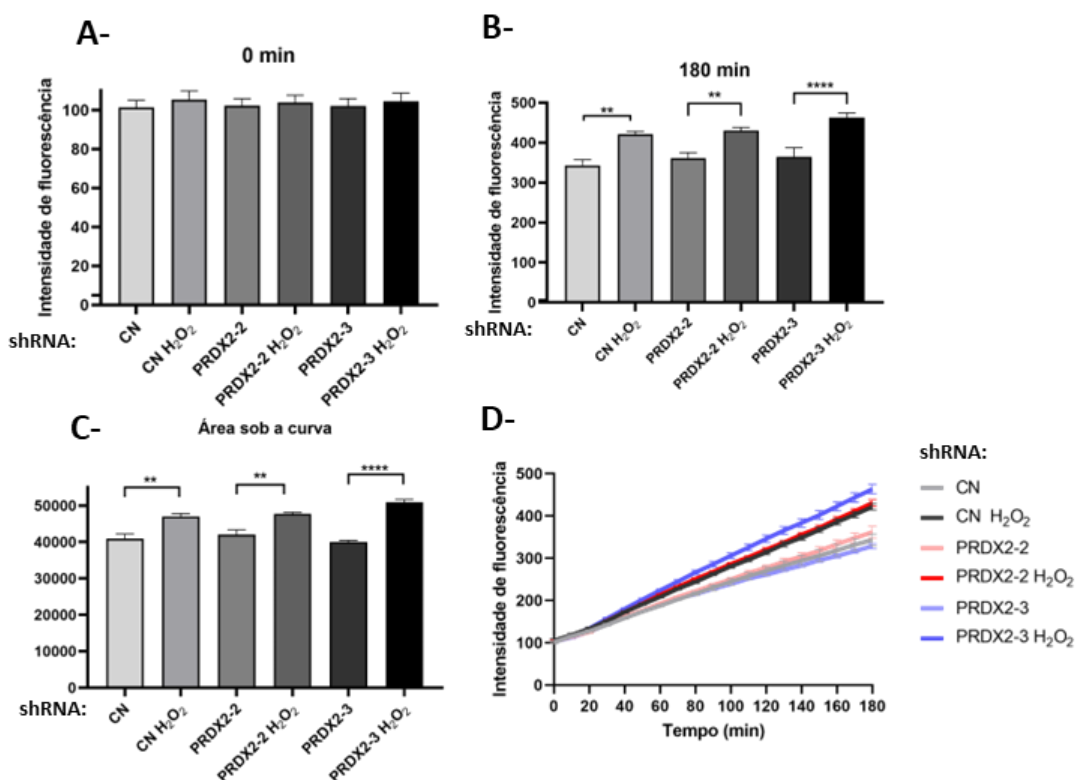
Linhagens: PRDX2-2 e PRDX2-3. Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao controle (*scramble*).

Fonte: Elaboração Própria.

Nós dosamos as interleucinas nas células infectadas com seqüências de shRNA PRDX2, mas estas não apresentaram diferença de expressão entre elas.

O ensaio de DHR mostrou que todas as linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2 (CN- *scramble*, PRDX2-2 e PRDX2-3) foram sensíveis ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumentando as espécies reativas de oxigênio na presença do agente oxidante. A cinética demonstrou a maior tendência de produção de ROS na PRDX2-3, sendo a linhagem com a maior produção de ROS após a exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $p < 0,001$ ) se comparada ao não tratado, como esperado (Figura 47).

Figura 47. Avaliação cinética da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em linhagem de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2



Linhagens: CN- *scramble*, PRDX2-2 e PRDX2-3. A- Geração de ROS no tempo 0, B- Geração de ROS no tempo final de 3 horas, C- Área sob a curva de ROS após 3 horas e D- Gráfico da área sob a curva após 3 horas. Os valores estão indicados por média  $\pm$  erro padrão de resultados em triplicata de três experimentos independentes. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200  $\mu$ M) como controle positivo de produção de ROS. A análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida de teste de Tukey, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  comparado ao não tratado. Fonte: Elaboração Própria.

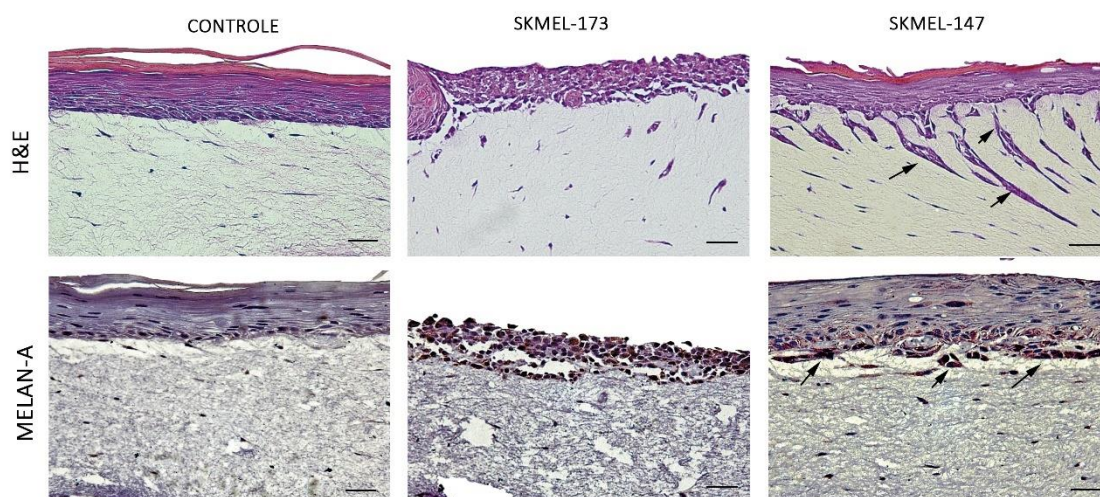
Pele humana reconstruída (PHR) com as linhagens celulares NRAS naive e silenciadas por shRNA

A pele humana reconstruída (PHR) foi realizada como método de validação de nossos dados in vitro em 2D. A PHR controle sem melanoma mostra a formação das camadas da pele, epiderme e derme. A PHR com melanoma SKMEL-173 mostra a camada da derme bem



formada e o melanoma sobrepondo toda porção da epiderme, diferentemente da PHR com melanoma SKMEL-147 com a epiderme e derme bem visíveis, bem como o destaque das células de melanoma invadindo a derme, confirmando o perfil invasivo da SKMEL-147. Não observamos a camada epitelial em nenhuma das PHRs com melanoma SKMEL-173 naive ou nas linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2. As PHRs foram coradas em H&E para observação da histologia da pele e fizemos a marcação imuno-histoquímica de Melan-A para confirmação da presença das células de melanoma, as quais são coradas em marrom (Figura 48).

Figura 48. Fotomicrografia das peles humanas reconstruídas com melanoma NRAS mutante



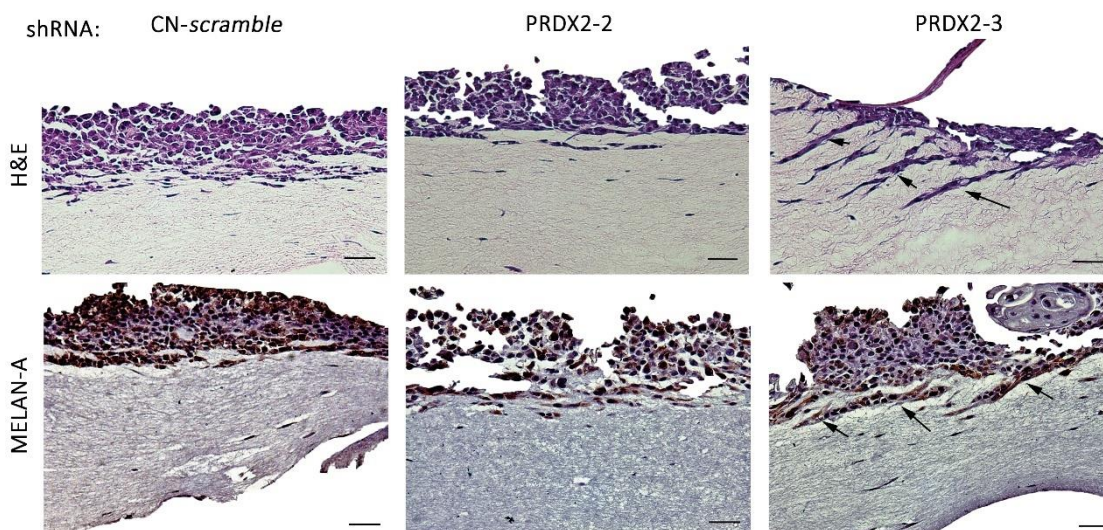
Pele controle sem melanoma, pele com melanoma NRAS mutante (SKMEL-147 e SKMEL-173) coradas com Hematoxilina & Eosina e marcação imuno-histoquímica de Melan-A, no aumento de 20x. As setas indicam os sítios de invasão de melanoma na derme.

Fonte: Elaboração Própria.

Utilizando as células infectadas com sequências de shRNA PRDX2, observamos a PHR *scramble* com perfil semelhante da PHR com melanoma SKMEL-173 naive. Em comparação, a PHR com melanoma PRDX2-2 apresentou pouca diferença em relação ao *scramble*, com algumas células superficiais invadindo a derme. Por outro lado, a PHR com melanoma PRDX2-3 mostra vários sítios de invasão na derme, demonstrando que o *knockdown* de PRDX2 aumentou o potencial invasivo da SKMEL-173 em modelos de PHR (Figura 49).

Figura 49. Fotomicrografia das peles humanas reconstruídas com melanoma infectadas com

## sequências de shRNA PRDX2



Peles com melanoma *knockdown* de PRDX2 (*scramble* como controle, PRDX2-2 e PRDX2-3) coradas com Hematoxilina & Eosina e marcação imuno-histoquímica de Melan-A, no aumento de 20x. As setas indicam os sítios de invasão de melanoma na derme.

Fonte: Elaboração Própria.

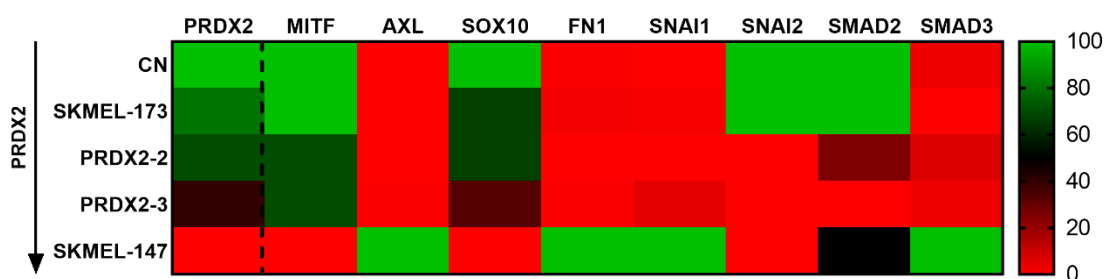
#### Correlação da PRDX2 com marcadores fenotípicos de invasão (assinaturas de genes invasivos)

Após análises que investigaram a relação de PRDX2 com o processo invasivo, verificamos a expressão gênica representado por um painel, que incluiu diversos genes relacionados com a progressão do tumor em todas as linhagens estudadas. Os dados confirmaram as expressões proteicas previamente observadas, com a expressão gênica de PRDX2 sendo maior na linhagem SKMEL-173 naive e *scramble*, mediana na PRDX2-2 e diminuída na PRDX2-3 até não haver expressão na SKMEL-147 (Figura 50). A fim de comparar os perfis, todos os genes foram correlacionados entre si, apresentados na figura 51.

A expressão de *MITF* apresentou uma correlação positiva com *PRDX2*, enquanto *AXL* apresentou uma correlação inversa com a expressão de *PRDX2* e *MITF*. *SOX10* apresentou uma correlação positiva com *MITF*, já descrita na literatura, e também com *PRDX2*. *FNI* e *SNAI1*, marcadores de EMT, foram expressos negativamente nas linhagens com *PRDX2*. A expressão de *SNAI2*, por sua vez, apresentou uma correlação inversa com *SNAI1* e proporcional à presença de *PRDX2*.

A expressão de *SMAD2* apresentou uma correlação positiva com a expressão de *PRDX2*, enquanto *SMAD3* revelou uma correlação inversa com *PRDX2*. Além disso, *SMAD2* e *SMAD3* apresentaram uma correlação inversa entre si.

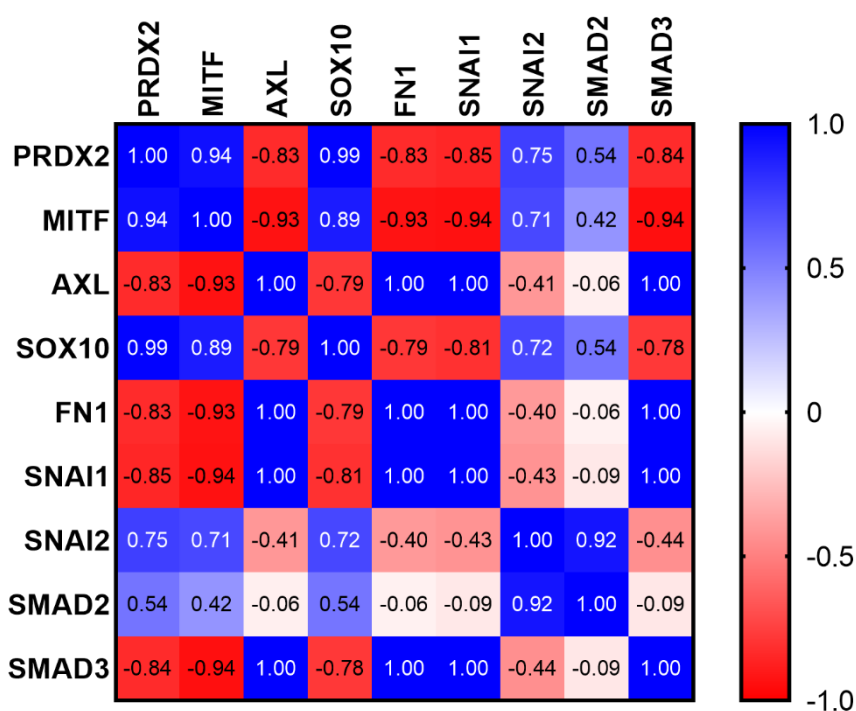
Figura 50. Expressão de genes normalizado com as linhagens de melanoma NRAS mutante e linhagens infectadas com seqüências de shRNA PRDX2



Linhagens: SKMEL-147, SKMEL-173, CN- scramble, PRDX2-2 e PRDX2-3 por RT-PCR. Somente os genes SOX10, SNAI2 e SMAD2 não tiveram uma correlação significativa ( $p > 0,05$ ).

Fonte: Elaboração Própria.

Figura 51. Correlação de Pearson da expressão de todos os genes testados por RT-PCR

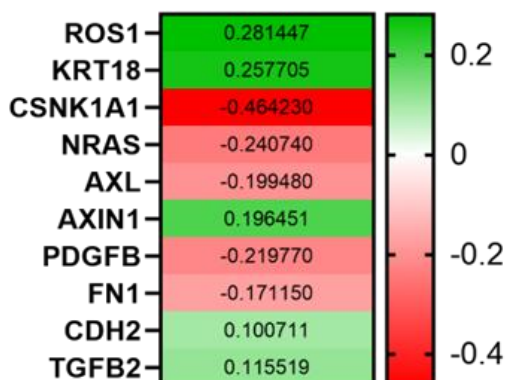


Fonte: Elaboração Própria.

Avaliamos a correlação *in silico* de genes envolvidos com a progressão do tumor e a expressão de PRDX2 em tumores primários de melanoma com mutação em NRAS. Esses resultados mostraram uma correlação positiva com *ROSI*, *KRT18*, *AXIN1*, bem como uma correlação negativa com *CSNK1A1*, *NRAS*, *AXL*, e *FN1*, confirmando alguns dados já apresentados (Figura 52).



Figura 52. Correlação da expressão gênica de *PRDX2* com genes pró-tumorais em coorte de melanomas primários com mutação em *NRAS*



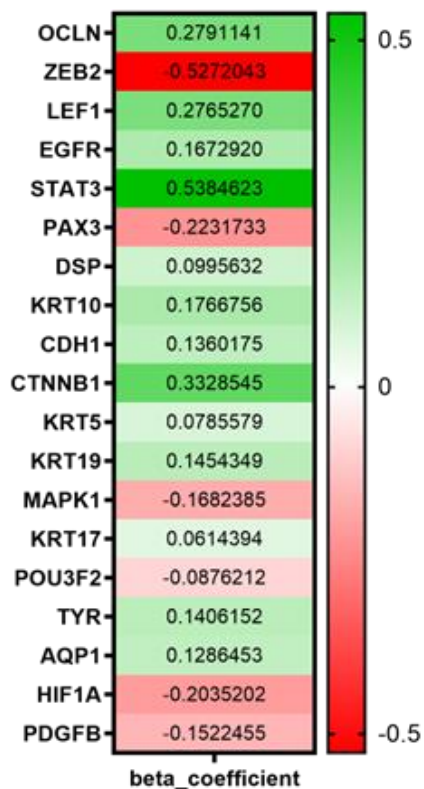
Coorte de melanomas primários *NRAS* (n= 142) com  $p < 0,05$ .

Fonte: Elaboração Própria.

Avaliamos a correlação *in silico* de genes envolvidos com a progressão do tumor e a expressão de *PRDX2* em tumores primários de melanoma, representando diversos marcadores relacionados à invasão e metástase, tais como *ZEB2*, o qual apresentou uma correlação negativa com *PRDX2*; *STAT3*, apresentando uma correlação positiva com *PRDX2*; e *CTNNB* ( $\beta$ -catenina) e *CDH1* (E-caderina), relacionados à estabilização de junções aderentes, ambos os quais apresentaram correlação positiva com *PRDX2* (Figura 53), sendo essas últimas confirmadas por ensaios *in vitro*.

Figura 53. Correlação da expressão gênica de *PRDX2* com genes pró-tumorais em coorte de

## melanomas primários

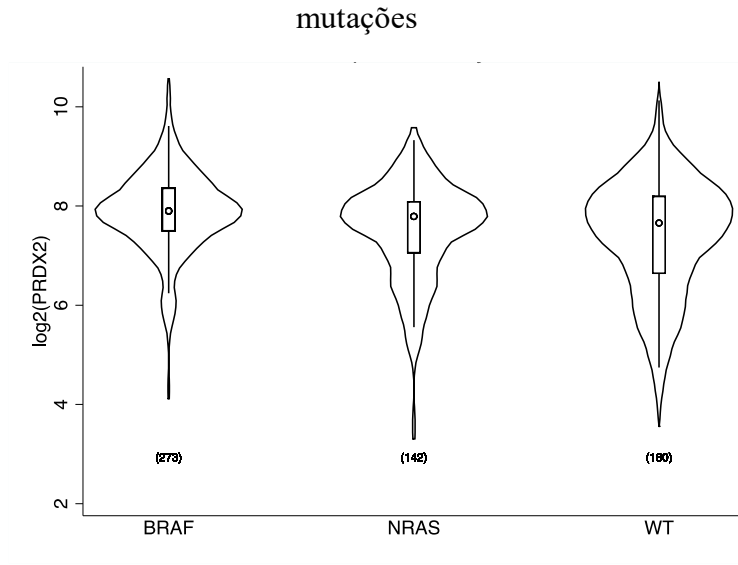


Coorte de melanomas primários (n=703) com  $p < 0,05$ .  
 Fonte: Elaboração Própria.

Análises *in silico* de PRDX2 de uma coorte de pacientes com melanomas primários relacionado com as características clínicas da doença

Demonstrando a importância de PRDX2 para melanoma NRAS mutante, realizamos uma análise *in silico* de uma coorte de melanomas primários com mutação em BRAF, NRAS e WT (703 indivíduos). Os resultados mostraram que melanoma com mutação em NRAS tiveram uma menor expressão PRDX2 quando comparado ao melanoma BRAF (Figura 54).

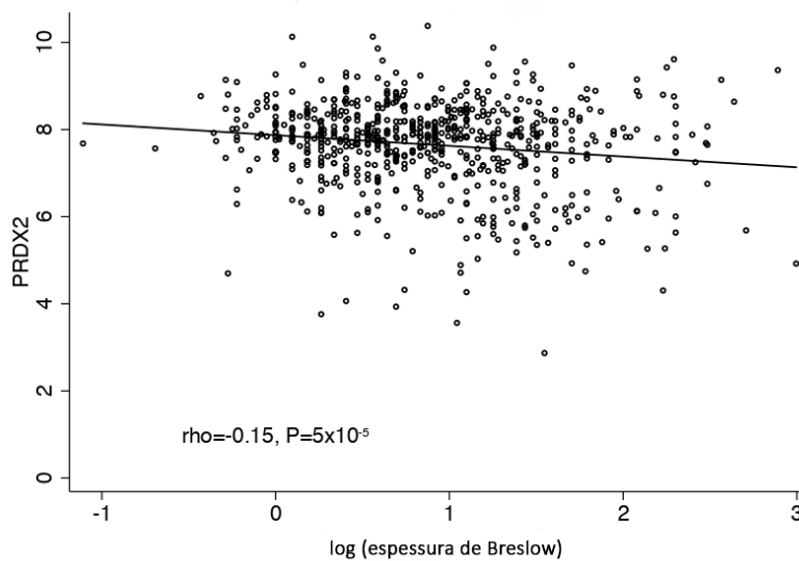
Figura 54. Expressão de PRDX2 em tumores de melanoma primários com diferentes tipos de



Mutações: BRAF, NRAS e WT (*wide-type*- tipo selvagem) com  $p < 0,001$ .  
 Fonte: Elaboração Própria.

Além disso, realizamos análises *in silico* objetivando a relação da PRDX2 com a evolução da doença em pacientes com tumores primários. Para isso, correlacionamos a PRDX2 com a espessura de Breslow, um indicativo de evolução do melanoma na clínica, mostrando que, quanto menor a expressão de PRDX2, maior a espessura de Breslow (Figura 55).

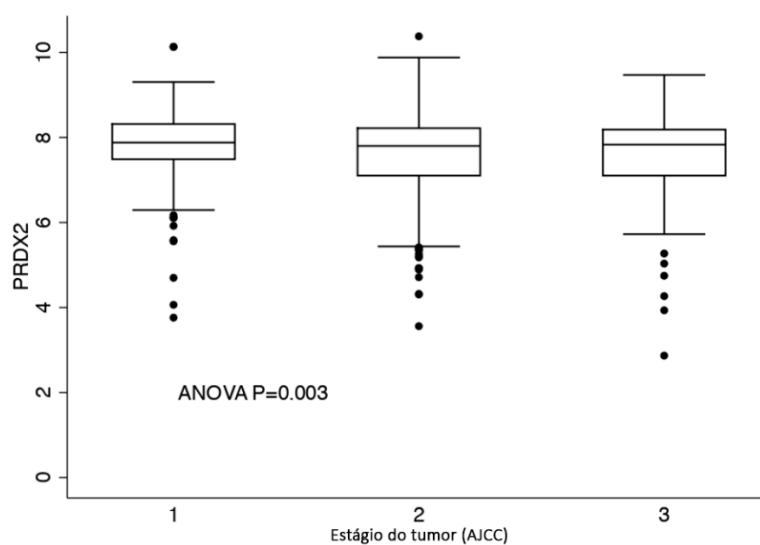
Figura 55. Correlação da expressão de PRDX2 com a espessura de Breslow de melanomas primários



Fonte: Elaboração Própria. N=703.

Comparamos também o estadiamento do tumor (AJCC), o qual define a quantidade e disseminação do câncer no paciente, com o maior estágio remetendo a um pior prognóstico. O maior estadiamento (estágio III) do melanoma foi correlacionado com uma menor expressão de PRDX2 (Figura 56).

Figura 56. Correlação da expressão de PRDX2 com o estadiamento do tumor primário (AJCC)

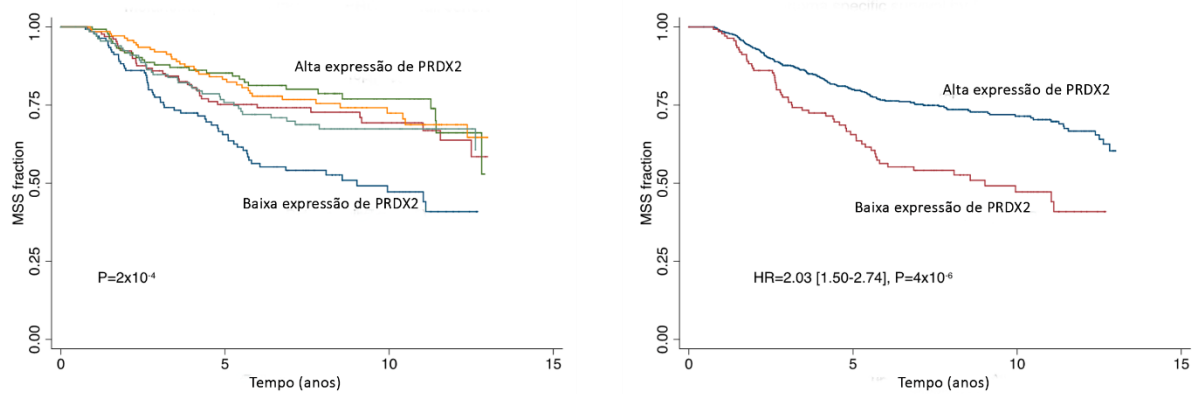


Fonte: Elaboração Própria. N= 703.

A figura 57 mostra a curva de sobrevida de uma coorte de 703 pacientes com melanomas primários, de acordo com a expressão de PRDX2. A alta expressão de PRDX2 foi relacionada com uma maior taxa de sobrevida quando comparada aos pacientes com baixa expressão desse gene, considerando que (HR: 2,03,  $p < 0,001$ ) pacientes com expressão de PRDX2 têm uma sobrevida duas vezes maior se comparados com pacientes com baixa expressão de PRDX2.

Figura 57. Curva de sobrevida da coorte de pacientes com melanomas primários

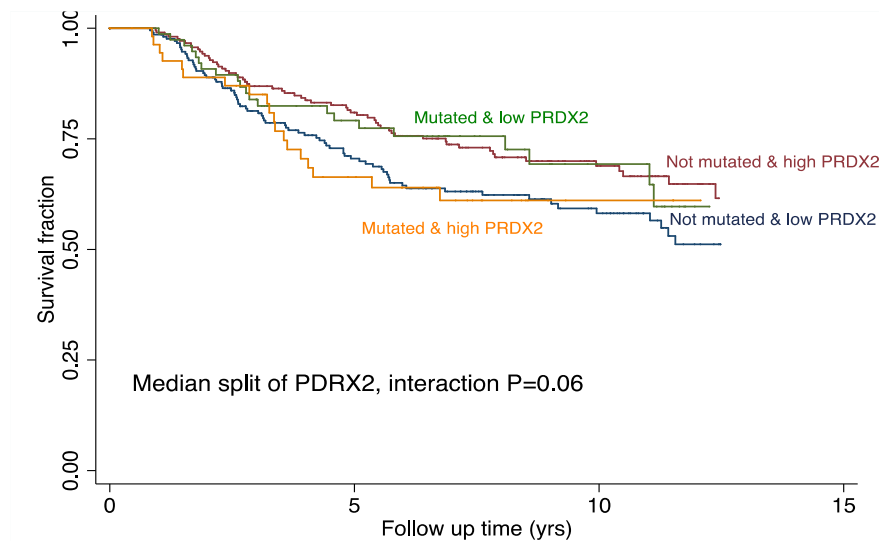
## correlacionados com a expressão de PRDX2



Coorte de n=703, 204 mortes.  
Fonte: Elaboração Própria.

A figura 58 mostra a curva de sobrevida da coorte de pacientes com melanomas NRAS mutantes separados em grupos de acordo com a diferença de expressão de PRDX2, demonstrando que em tumores de melanoma com mutação em NRAS da coorte analisada não apresenta diferença significativa entre o grupo que expressa ou não PRDX2. Sendo assim, não apresenta uma relação direta de PRDX2 com a mutação em NRAS em nossos dados.

Figura 58. Curva de sobrevida de pacientes com melanomas NRAS mutantes pela expressão de PRDX2



Coorte de n=142.  
Fonte: Elaboração Própria.

## DISCUSSÃO

### Ausência de PRDX2 altera o perfil fenotípico em melanoma NRAS mutante

A peroxirredoxina 2 (PRDX2) é uma enzima antioxidante que desempenha um papel importante no equilíbrio redox da carcinogênese. Hintsala e colaboradores, 2015 mostraram que a expressão de PRDX2 está diferencialmente regulada em melanomas malignos, onde sua expressão é diminuída (HINTSALA et al., 2015). Especificamente, um estudo mostrou que a diminuição da expressão de PRDX2 em melanomas é devido a um silenciamento no promotor de metilação envolvido na progressão do melanoma (FURUTA et al., 2006).

Embora alguns estudos tenham investigado o papel de PRDX2 em melanoma com mutação em BRAF, poucos foram realizados em melanoma NRAS mutante. Os melanomas com mutação em NRAS são tumores mais agressivos, e a escassez de dados na literatura sobre o papel das PRDXs em melanoma NRAS mutante, bem como a falta de uma terapia-alvo dirigida a esse tipo de mutação, evidencia a necessidade de mais estudos. Dessa forma, decidimos investigar qual seria a função da PRDX2 nesse contexto.

No presente estudo, verificamos que apenas a PRDX2 apresentou uma expressão diferencial nas linhagens de melanoma estudadas (SKMEL-147 e 173), e não a PRDX1, o que foi consistente com o estudo de Lee e colaboradores (LEE et al., 2013). Esses resultados sugerem que a PRDX2 pode ter um papel mais crítico do que a PRDX1 na regulação do equilíbrio redox e na progressão do melanoma. Por isso, foi proposto o desenvolvimento de um conjunto de dados em buscar de verificar seu papel.

Nossos dados demonstraram que a linhagem que expressa mais PRDX2 (SKMEL-173) apresenta maior nível de ERK fosforilado e menor tempo de dobramento celular, indicativos de proliferação. Esses resultados são contrários a um estudo com melanoma BRAF, no qual a expressão de PRDX2 foi relacionada a uma menor taxa de proliferação (LEE et al., 2013). Por outro lado, condizem com um estudo em que a PRDX2 promoveu a ativação de ERK e proliferação em tumores hepáticos (PARK et al., 2016).

Nossos resultados apontaram que a modulação de PRDX2 através de silenciamento gênico utilizando *shRNA* está relacionada com o aumento da invasão, concordando com estudos que relacionaram o silenciamento de PRDX2 como promotor de migração e invasão em tumores gástricos e de melanomas (HONG et al., 2018; LEE et al., 2013).

A linhagem com PRDX2 teve as expressões de MITF<sup>alto</sup>/AXL<sup>baixo</sup> correlacionadas com um perfil proliferativo. Ao mesmo tempo, a linhagem sem PRDX2 teve as expressões de MITF<sup>baixo</sup>/AXL<sup>alto</sup> associadas a um perfil invasivo. Isso condiz com o modelo de reostato já

descrito na literatura (MÜLLER et al., 2014; RAMBOW; MARINE; GODING, 2019b). O MITF é considerado um marcador do fenótipo proliferativo das células de melanoma, e estudos têm associado baixos níveis de MITF com uma parada no ciclo celular em G1 e maior invasividade (CARREIRA et al., 2006). Tumores de melanoma com assinaturas de genes invasivos também apresentaram baixa expressão de MITF. Além disso, a baixa expressão de MITF tem sido relacionada à maior expressão de AXL e à resistência a inibidores de MAPK e imunoterapias, conforme descrito em um estudo recente (HUANG et al., 2021). Esses resultados sugerem que a expressão de MITF e AXL podem ser importantes indicadores do comportamento das células de melanoma e de sua resposta a diferentes terapias.

#### PRDX2 modula genes, proteínas e citocinas pró-tumorais em melanoma NRAS mutante

Realizamos análise *in vitro* da expressão de E-caderina em linhagens celulares NRAS, sendo que a E-caderina não foi expressa nas linhagens de melanoma, somente nos melanócitos e nos queratinócitos. Hao e colaboradores (2012) observaram altos níveis de E-caderina em melanócitos e níveis indetectáveis em linhagens de melanoma de diversos estágios (HAO et al., 2012), o que corrobora nossos resultados. É amplamente descrito que tumores epiteliais perdem parcial ou totalmente a expressão de E-caderina em progressos de malignidade, de invasão e metástases (VAN ROY; BERX, 2008).

A expressão de  $\beta$ -catenina foi alta na SKMEL-173 e reduzida nas linhagens infectadas com sequências de shRNA PRDX2. Já foi mostrado que o *knockdown* de PRDX2 em linhagens de melanoma BRAF tiveram uma redução nos níveis de  $\beta$ -catenina na membrana plasmática, pois a PRDX2 está envolvida na adesão celular pela estabilização de junções aderentes pelos complexos de E-caderina/  $\beta$ -catenina (LEE et al., 2013). Nossos dados mostraram que as linhagens com alta expressão de PRDX2 (SKMEL-173 naive e *scramble*), tiveram alta expressão de  $\beta$ -catenina e MITF relacionado ao fenótipo proliferativo e não invasivo. A  $\beta$ -catenina também participa da via canônica de Wnt, que coopera com a sinalização de MAP quinases para regular a expressão e atividade de MITF em células proliferativas de melanoma. Nesse processo, a via canônica antagoniza a via não canônica WNT5A, promovendo a invasão e metástase das células de melanoma (WEBSTER; KUGEL; WEERARATNA, 2015).

A N-caderina foi mais expressa na linhagem SKMEL-147, a qual não possui PRDX2 e é a linhagem de maior potencial invasivo. Isso corrobora com a literatura, que demonstra que a N-caderina tem potencial invasivo e metastático relacionado a um pior prognóstico (CAO; WANG; LENG, 2019). A expressão de N-caderina já foi correlacionada positivamente com

Snail e negativamente com E-caderina, sendo que a expressão de Snail está envolvida no fenótipo mesenquimal invasivo (HAO et al., 2012; RIBATTI; TAMMA; ANNESE, 2020). Estes resultados estão em concordância com nossos dados, pois há uma maior expressão de N-caderina e de Snail nas linhagens mais invasivas SKMEL-147 e PRDX2-3, respectivamente.

Observamos que a SKMEL-147 apresenta altas expressões de interleucinas (IL-6 e IL-8), sendo a linhagem mais invasiva e com expressão de N-caderina. Já foi relatado que os níveis de IL-6 e IL-8 são mais elevados em pacientes com melanoma maligno, sendo a IL-8 correlacionada com outros tumores por promover a EMT e estando envolvido em diversas vias responsáveis pela agressividade do tumor (FILIMON et al., 2021). Além disso, a IL-6 tem sido descrita como um marcador de pior prognóstico em pacientes com melanoma cutâneo, bem como em melanoma metastático com altos níveis da interleucina pela regulação de Twist e N-caderina (NA et al., 2013).

Em vista do potencial de PRDX2 nas linhagens celulares, verificamos a expressão de outras proteínas antioxidantes que poderiam estar envolvidas e influenciando esse processo redox. A expressão gênica mostrou diferença entre as linhagens de melanoma NRAS mutante somente nos genes de *PRDX2* e *TXN* (tiorredoxina), com diferenças contrárias: a SKMEL-147 expressa tiorredoxina, enquanto a SKMEL-173 expressa peroxirredoxina 2. A expressão de tiorredoxina está relacionada com a manutenção de ROS e ação na tumorigênese, e estudos encontraram um aumento significativo de TXN em melanoma metastático em relação ao melanoma primário, sendo este aumentado em relação ao nevo melanocítico (CARPENTER; BECKER; INDRA, 2022; CASSIDY et al., 2015). Isso condiz com nossos resultados, pois a SKMEL-147, com maior expressão de *TXN* é mais invasiva, seguida da SKMEL-173 não invasiva e com uma expressão intermediária, e, por último, o melanócito, com a menor expressão de *TXN*.

Considerando o papel das enzimas antioxidantes, buscamos verificar a capacidade de produção basal de ROS nas linhagens celulares de melanoma NRAS mutante e, como controle positivo, utilizamos um agente oxidante ( $H_2O_2$ ). Demonstramos que a SKMEL-173 respondeu ao agente oxidante, porém a SKMEL-147 não expressou diferença frente ao  $H_2O_2$ . Apesar do resultado inesperado, este sugere um mecanismo de escape ou uma resposta adaptativa para neutralização de ROS, resultado da maior expressão da tiorredoxina (*TXN*) na SKMEL-147.

A modulação farmacológica e genética de PRDX2 altera o perfil fenotípico celular

Considerando o papel da PRDX2 visto nos experimentos anteriores, buscamos um



tratamento utilizando a gliotoxina (GT), um possível mimético de PRDX2. A GT é um composto antioxidante com atividade de peroxidase dependente de TXN, catalisando a redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em H<sub>2</sub>O (CHOI et al., 2007). O ensaio de viabilidade mostrou um alto potencial citotóxico da GT por suas concentrações em nanomolar, capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular tanto das células normais quanto do melanoma. O ensaio de colônias mostra a ação do composto após um longo período de tratamento em ambas as linhagens, sem seletividade entre elas. Apesar de não ser seletivo, houve uma diminuição da proliferação em ambas as linhagens de melanoma NRAS mutante, como já mostrado em linhagens de melanoma BRAF (LEE et al., 2013).

O ensaio de migração apresentou uma diferença somente na SKMEL-147, provavelmente por sua falta de PRDX2. A GT pode estar atuando como um mimético de PRDX2, alterando e diminuindo a capacidade migratória especificamente dessa linhagem. Este resultado concorda com o estudo de Lee e colaboradores que, após o tratamento com GT, observaram uma redução na migração de células de melanoma BRAF (LEE et al., 2013).

Para confirmar nossos dados anteriores, utilizamos *shRNA* para inibição gênica da *PRDX2* na linhagem de melanoma SKMEL-173. A inibição gênica de *PRDX2* gerou a linhagem PRDX2-2, com expressão proteica de 50% de PRDX2, bem como a linhagem PRDX2-3, com expressão gênica e proteica de PRDX2 de 36% em relação ao controle. Observamos uma diferença morfológica somente na linhagem *knockdown* PRDX2-3.

As linhagens infectadas com sequências de *shRNA* PRDX2 não apresentaram diferenças significativas entre os tempos de dobramento no ensaio de proliferação e na fosforilação de ERK. Esse dado não nos permite concluir sobre o potencial proliferativo de PRDX2, embora haja uma alteração em melanoma NRAS mutante.

Por outro lado, o potencial invasivo da linhagem PRDX2-3 aumentou em relação ao *scramble*, e esta foi a linhagem que apresentou maior inibição de PRDX2. Sendo assim, a inibição de PRDX2 foi capaz de aumentar o potencial invasivo da SKMEL-173, que anteriormente não invadia. Este dado condiz com um estudo utilizando linhagens de melanoma G361 e A375, que apresentou um aumento de migração após a inibição de PRDX2 em melanoma BRAF (LEE et al., 2013). Além disso, foi visto uma maior atividade migratória em células de câncer gástrico que não expressavam PRDX2 (HONG et al., 2018).

A expressão proteica de MITF foi reduzida na linhagem PRDX2-3 e teve maior invasão. Sabe-se que a supressão de MITF está relacionada com o processo invasivo já relatado em diversos trabalhos (ARAZARENA; WELLBROCK, 2019b; GELMI et al., 2022; HUANG et al., 2021), agindo na transição fenotípica (RAMBOW; MARINE; GODING, 2019b). Os baixos

níveis de MITF são uma condição necessária para a invasão do melanoma, mas não suficiente (GODING; ARNHEITER, 2019), sendo necessária a modulação de outras proteínas relacionadas a EMT agindo para alteração do perfil fenotípico. O MITF também foi relacionado com a resposta celular a ROS em um estudo de tratamento por berberina, a qual mostrou um efeito protetivo ao estresse oxidativo pela ativação da via de MITF em melanócitos (JIANG et al., 2019). Dessa forma identificamos a geração de ROS nas linhagens de melanoma infectadas com sequências de shRNA PRDX2, responsivas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com a linhagem PRDX2-3 apresentando a maior expressão de ROS e a menor expressão de MITF. Além disso, o alto nível de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células com baixa expressão de PRDX2 foi demonstrado previamente, uma vez que a PRDX2 é uma enzima antioxidante que regula o nível intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células de melanoma e células de tumor gástrico (HONG et al., 2018; LEE et al., 2013), confirmando nossos dados.

Como método de validação de nossos resultados em 2D, utilizamos a pele humana reconstruída (PHR) por mimetizar a construção da pele humana *in vitro*. Os modelos tridimensionais (3D) da PHR imitam a anatomia da pele humana e servem como modelo para a formação de melanoma com interação das células da pele. A PHR com melanoma preenche a lacuna entre a simplicidade do modelo 2D convencional de cultura de células e a complexidade de modelos em animais (BROHEM et al., 2011; LEIKEIM et al., 2022). O modelo de pele *in vitro* permite também verificar o comportamento das células de melanoma em seu microambiente original, com a formação de nichos na pele pela proliferação das células e/ou sítios de invasão na junção epidérmica-dérmica pela quebra de componentes na membrana basal, sendo uma importante ferramenta para avaliação da progressão do melanoma (HILL et al., 2015).

O melanoma SK-MEL-173 apresenta altas taxas de proliferação celular. Por isso, a proporção de melanoma na pele cresceu, sobrepondo a epiderme. As linhagens com menor expressão de PRDX2 (PRDX2-3 e SKMEL-147) apresentaram sítios de invasão em PHR, confirmando nossos dados em 2D. Isso demonstra que a diminuição da expressão de PRDX2 por *shRNA* ou ausência basal foram capazes de aumentar a capacidade invasiva das células de melanoma NRAS mutante, modulando seu perfil fenotípico em PHR.

Nossos dados indicam um potencial metastático em melanoma NRAS mutante com baixa expressão de PRDX2, corroborando com estudo *in vitro* que mostraram uma regulação negativa do gene *PRDX2* em melanomas metastáticos em relação aos melanomas primários (CARTA et al., 2005), estudo *in silico* com diminuição de PRDX2 em melanoma metastático em relação ao nevo displásico (CARVALHO et al., 2022), além de estudo *in vivo* pelo aumento

da invasão e metástase para pulmões de camundongos pelo *knockdown* de *PRDX2* em melanoma BRAF (LEE et al., 2013).

#### Correlação de genes pró-tumorais com expressão de *PRDX2*

O processo invasivo verificado nas linhagens estudadas ocorre por alterações em genes de progressão do melanoma. Portanto, verificamos a expressão gênica comparando as linhagens entre si. Demonstramos uma diminuição de *PRDX2* na linhagem PRDX2-3 e ausência total na SKMEL-147, confirmando os resultados de expressão proteica. A *TXN* está inversamente correlacionada com *PRDX2*. Nossos resultados sugerem que a perda da atividade antioxidante de *PRDX2* na linhagem SKMEL-147 pode gerar uma resposta adaptativa com a elevação da *TXN* para homeostase redox.

MITF e SOX10 são coexpressos com *PRDX2*, enquanto AXL não foi expresso com *PRDX2*. Estudos correlacionaram anteriormente a expressão de MITF e AXL inversamente proporcionais, sendo a relação baixo MITF/alto AXL associada com maior potencial invasivo, já visto em nossos resultados anteriores. SOX10 também participa no desenvolvimento dos melanócitos e células da crista neural, podendo transativar diretamente o promotor de MITF. Sendo assim, MITF e SOX10 foram identificados como marcadores de proliferação (MÜLLER et al., 2014; WESSELY et al., 2021).

*FNI*, o gene da proteína fibronectina, foi expresso negativamente com *PRDX2*. Este é um componente da matriz extracelular que já foi reportado como promotor da progressão tumoral, expresso em nichos metastáticos de células de melanoma em pulmão e identificado por modular a via Wnt/ $\beta$ -catenina (SPADA et al., 2021).

Houve uma correlação inversa de *SNAIL* com *SNAI2*, sendo *PRDX2* correlacionado negativamente com *SNAIL*, de fenótipo mesenquimal, e positivamente com *SNAI2*, de fenótipo epitelial. A família de proteínas Snail foram bem estudadas devido ao seu processo na EMT e divididas em proteínas Snail (gene *SNAIL*- Repressores transcricionais da família Snail 1) e Slug (gene *SNAI2*- Repressores transcricionais da família Snail 2). Snail é expresso por células mesenquimais, regulado positivamente na EMT, enquanto Slug é expresso por células epiteliais. Dados de RNAm mostraram que Snail pode reprimir a expressão de Slug (*SNAI2*) (STERNECK; PORIA; BALAMURUGAN, 2020; SUNDARARAJAN et al., 2019), concordando com nossos dados.

A correlação positiva de *SNAIL* e *SMAD3* ocorre pela ativação de *SNAIL* pelo *SMAD3* atuando no fator transcricional na EMT e inibindo a expressão de E-caderina mediado por

*SNAIL* (DU et al., 2018). A *PRDX2*, por sua vez, teve uma correlação positiva com *SMAD2* e negativa com *SMAD3*, associada com perfil anti-invasivo. A perda de *SMAD2* foi associada a desdiferenciação, perda de E-caderina e ativação de Snail (HOOT et al., 2008).

As análises *in silico* correlacionaram *PRDX2* com marcadores diferencialmente expressos na coorte de melanoma com mutação em *NRAS*. *ROS1* e *AXIN1* tiveram uma correlação positiva com *PRDX2*, ambos relacionados com perfil proliferativo. *ROS1* é um receptor tirosina quinase envolvido em diversos cânceres. Sua ativação controla proliferação, diferenciação e crescimento celular (SHAW et al., 2014), enquanto *AXIN1* regula a via Wnt/ $\beta$ -catenina (BIECHELE et al., 2012).

A *PRDX2* teve uma correlação positiva com *KRT18* e negativa com *CSNK1A1*, relacionado com um perfil menos invasivo. A diminuição da queratina 18 (*KRT18*) já foi associada com a EMT pelo aumento de migração e invasão em células epiteliais de câncer, pois as queratinas formam filamentos do citoesqueleto, impactando a arquitetura celular (FORTIER; ASSELIN; CADRIN, 2013). O *CSNK1A1* também tem papel no citoesqueleto e mobilidade celular, e a maior expressão desse gene está relacionada à metástase, sendo este um marcador de malignidade negativamente correlacionado com a  $\beta$ -catenina (SUN et al., 2011). As expressões de *AXL*, *NRAS* e *FNI* foram negativamente correlacionadas com *PRDX2*, em concordância com nossos dados *in vitro*.

Dentre os genes correlacionados *in silico* em uma coorte total de tumores de melanoma primário, destacamos os principais e mais correlacionados com *PRDX2*:

*ZEB2* (Zinc finger E-box binding homeobox 2) mostrou uma correlação negativa com *PRDX2*, sendo um regulador transcricional de ligação ao DNA que dimeriza o E-box em diferentes promotores, tal como promotor de E-caderina, que regula negativamente a ela e a outros genes epiteliais, sendo um indutor da EMT. *ZEB2* está mais expresso em invasões metastáticas e está associado com o grau de malignidade (FARDI et al., 2019; SATHYANARAYANAN; CHANDRASEKARAN; KARUNAGARAN, 2017).

*STAT3* (Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3) mostrou uma correlação positiva com *PRDX2*, pois a *PRDX2* regula a atividade transcricional mediada por *STAT3* via redox, visto que a *PRDX2* transfere equivalentes oxidativos para o *STAT3* (SOBOTTA et al., 2015).

*CTNNB1* e *CDH1* foram correlacionados positivamente com *PRDX2* e são os genes que codificam respectivamente a  $\beta$ -catenina e a E-caderina. Essas proteínas são consideradas supressores tumorais de invasão e metástase por atuarem na formação de complexos de membrana em junções aderentes.

PRDX2 está expressa em melanoma de pacientes com melhor prognóstico e maior sobrevida

Os dados de correlação *in silico* de tumores NRAS mostraram que o gene NRAS foi inversamente correlacionado com PRDX2, ou seja: tumores de melanoma NRAS mutante podem expressar menos PRDX2. Isso está de acordo com o gráfico mostrando que a expressão de PRDX2 foi menor em melanoma NRAS mutante em comparação ao melanoma BRAF, sugerindo que a regulação de PRDX2 possa ser diferente nessas duas subpopulações de melanomas.

Após a avaliação da expressão de PRDX2 em modelos 2D e 3D, buscamos verificar e prospectar o potencial desse alvo para o âmbito clínico. Análises *in silico* de uma coorte de pacientes com melanoma primário foram correlacionadas com variáveis clínicas. A relação da espessura de Breslow e estadiamento foi inversa em relação à expressão de PRDX2, o que significa que tumores com maior grau de malignidade clínica (espessura de Breslow e estadiamento) apresentaram menor expressão de PRDX2, relacionada a um pior prognóstico. O aumento da espessura de Breslow está relacionado à diminuição na taxa de sobrevivência dos pacientes (EL SHAROUNI et al., 2022), e o estadiamento demonstra a quantidade e disseminação do câncer no corpo do paciente (SCOLYER et al., 2020). A análise de sobrevida de pacientes com tumores de melanoma primário demonstrou que tumores com expressão de PRDX2 tiveram uma sobrevida maior em relação aos de menor expressão.

Todos esses fatores clínicos correlacionam a presença de PRDX2 como um fator positivo para o prognóstico, e um possível biomarcador. Estudo em osteosarcoma já propõe o uso de PRDX2 como biomarcador preditivo de resposta à quimioterapia com alta sensibilidade e especificidade para predição de resposta ao tratamento, podendo ser avaliada em amostras de biópsias e aplicações clínicas de PRDX2 em pacientes com osteosarcoma sem requerer exames adicionais invasivos (KUBOTA et al., 2013). A PRDX2 já foi identificada também como biomarcador de estresse oxidativo nas membranas de hemácias humanas em banco de sangue (RINALDUCCI et al., 2011), sendo assim, podemos prospectar o uso da PRDX2 como um biomarcador para tumores de melanomas metastáticos utilizando métodos não invasivos de detecção como sua dosagem pela corrente sanguínea.

Embora não tenhamos feito análises *in vivo*, nossos dados corroboraram os dados já vistos em trabalhos utilizando melanoma BRAF com modelos de camundongos. Além disso, verificamos a relação *in silico* utilizando dados de pacientes, com melanoma primário sendo muito importante para prospectar esse alvo em um âmbito clínico. Ademais, não foi possível realizar a reexpressão de PRDX2 por Crispr/Cas9 nessas linhagens devido ao seu alto custo.

Porém, nossos dados de inibição de PRDX2 e dados basais com alta e baixa expressão de PRDX2 podem nos dar um forte indicativo dessas relações. Apesar dessas limitações, esse trabalho trouxe contribuições significativas na discussão da PRDX2 como alvo e biomarcador para melanoma metastático, principalmente aqueles com mutação em NRAS.

## CONCLUSÃO

Nossos dados nos permitem afirmar que a PRDX2 modula a troca fenotípica em melanoma com mutação em NRAS. Essa afirmação tem como base a alteração da expressão de MITF e a diminuição do potencial invasivo pela alteração de diversos genes (SOX10, FN1, SNAI1, SNAI2, SMAD2 e SMAD3) e proteínas ( $\beta$ -catenina, N-caderina, Snail) relacionados com a EMT. A compreensão desses mecanismos de troca fenotípica pode ajudar a desenvolver terapias mais eficazes para combater a progressão do melanoma. Pode-se discutir aqui seu possível papel como biomarcador de metástases, associado ao prognóstico do paciente, ou mesmo como um alvo terapêutico, utilizando um tratamento que restaure a expressão de PRDX2. Detalhadamente, obtivemos que:

- As linhagens de melanoma com mutação em NRAS possuem diferentes níveis basais de expressão de PRDX2: a SKMEL-147, com baixa expressão, se relaciona com perfil invasivo, enquanto a SKMEL-173, com alta expressão, se relaciona com perfil proliferativo. A PRDX2 altera o perfil fenotípico em linhagens de melanoma NRAS mutante pela modulação de diversos marcadores EMT.
- A gliotoxina tem um potencial terapêutico como mimético de PRDX2 em linhagens de melanoma NRAS mutante, com redução na capacidade proliferativa e migratória das células.
- O silenciamento gênico de *PRDX2* por *shRNA* na linhagem SKMEL-173 naive apresentou uma diminuição gênica e proteica específica para PRDX2, a qual aumentou a capacidade invasiva dessas células de melanoma silenciadas.
- A expressão de PRDX2 foi associada negativamente com diversos marcadores de EMT que regulam invasão e metástase, com importante diminuição de MITF (fator de transcrição melanocítica) atuando na troca fenotípica e aumento de invasão, tanto no melanoma SKMEL-147 quanto em melanoma infectadas com sequências de *shRNA* PRDX2.

- A validação em modelos de PHR demonstrou que a perda da expressão de PRDX2 aumentou os sítios de invasão na derme, confirmando os dados em 2D.
- Dados *in silico* da coorte estudada com melanomas primários mostraram que a expressão de PRDX2 representa um melhor prognóstico, correlacionado com a maior sobrevida.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

- Verificar a regulação epigenética da expressão de PRDX2 nas linhagens de melanoma NRAS mutante, identificando os sítios de metilações nas ilhas CpG de sua região promotora.
- Avaliar o potencial da terapia epigenética com 5-aza-2'-deoxicitidina na linhagem com melanoma NRAS mutante, na possibilidade de reversão da hipermetilação e consequente reexpressão de PRDX2, com possível ação em sua capacidade invasiva e/ou proliferativa.
- Utilizar um inibidor farmacológico de PRDX2, Conoidina A (Sigma-Aldrich®), na linhagem com melanoma NRAS mutante, verificar a ação em sua capacidade invasiva e/ou proliferativa.
- Modelos *in vivo* para verificar o potencial metastático em modelos mais complexos de melanoma NRAS mutante com inibição de PRDX2.
- Edição gênica para maior expressão/reexpressão da *PRDX2* em linhagens de melanoma NRAS mutante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 20 jun. 2015.

AL MAHI, A.; ABLAIN, J. RAS pathway regulation in melanoma. **Disease Models & Mechanisms**, v. 15, n. 2, 2 fev. 2022.

ARAZARENA, I.; WELLBROCK, C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. **Nature reviews. Cancer**, v. 19, n. 7, p. 377–391, 1 jul. 2019a.

ARAZARENA, I.; WELLBROCK, C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. **Nature reviews. Cancer**, v. 19, n. 7, p. 377–391, 1 jul. 2019b.

ATKINS, M. B. et al. The State of Melanoma: Emergent Challenges and Opportunities. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 27, n. 10, p. 2678–2697, 1 maio 2021.

BALCH, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199–6206, dez. 2009.

BELL, M. R. et al. THE STRUCTURE OF GLIOTOXIN. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 4, p. 1001, 1 fev. 1958.

BIECHELE, T. L. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and AXIN1 regulate apoptosis mediated by inhibition of BRAFV600E kinase in human melanoma. **Science Signaling**, v. 5, n. 206, p. ra3, 10 jan. 2012.

BITTNER, M. et al. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. **Nature**, v. 406, n. 6795, p. 536–540, 3 ago. 2000.

BROHEM, C. A. et al. Artificial skin in perspective: concepts and applications. **Pigment cell & melanoma research**, v. 24, n. 1, p. 35–50, fev. 2011.

**Câncer de pele — Ministério da Saúde.** Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer-de-pele>>. Acesso em: 13 mar. 2023.

CAO, Z. Q.; WANG, Z.; LENG, P. Aberrant N-cadherin expression in cancer. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 118, 1 out. 2019.

CARPENTER, E. L.; BECKER, A. L.; INDRA, A. K. NRF2 and Key Transcriptional Targets in Melanoma Redox Manipulation. **Cancers**, v. 14, n. 6, 1 mar. 2022.

CARR, S.; SMITH, C.; WERNBERG, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. **The Surgical clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 1–12, fev. 2020.

CARREIRA, S. et al. Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. **Genes & development**, v. 20, n. 24, p. 3426–3439, 15 dez. 2006a.



CARREIRA, S. et al. Mitf regulation of Dial1 controls melanoma proliferation and invasiveness. **Genes & development**, v. 20, n. 24, p. 3426–3439, 15 dez. 2006b.

CARTA, F. et al. Analysis of candidate genes through a proteomics-based approach in primary cell lines from malignant melanomas and their metastases. **Melanoma research**, v. 15, n. 4, p. 235–244, ago. 2005.

CARVALHO, L. A. C. et al. Redox-Related Proteins in Melanoma Progression. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 3, 1 mar. 2022.

CASSIDY, P. B. et al. The role of thioredoxin reductase 1 in melanoma metabolism and metastasis. **Pigment cell & melanoma research**, v. 28, n. 6, p. 685–695, 1 nov. 2015.

CASTILLO, P. et al. Implementation of an NGS panel for clinical practice in paraffin-embedded tissue samples from locally advanced and metastatic melanoma patients. **Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy**, v. 1, n. 2, p. 101–108, 28 abr. 2020.

CHAE, H. Z.; CHUNG, S. J.; RHEE, S. G. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 44, p. 27670–27678, 4 nov. 1994.

CHANDIMALI, N.; JEONG, D. K.; KWON, T. Peroxiredoxin II Regulates Cancer Stem Cells and Stemness-Associated Properties of Cancers. **Cancers**, v. 10, n. 9, 3 set. 2018.

CHOI, H. S. et al. Discovery of gliotoxin as a new small molecule targeting thioredoxin redox system. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 359, n. 3, p. 523–528, 3 ago. 2007.

COSGAREA, I. et al. Update on the clinical use of kinase inhibitors in melanoma. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, v. 15, n. 9, p. 887–893, 1 set. 2017.

CURTIN, J. A. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 20, p. 2135–2147, 17 nov. 2005.

D'ORAZIO, J. et al. UV Radiation and the Skin. **International Journal of Molecular Sciences** **2013**, Vol. 14, Pages 12222-12248, v. 14, n. 6, p. 12222–12248, 7 jun. 2013.

DAMSKY, W. E.; BOSENBERG, M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. **Oncogene**, v. 36, n. 42, p. 5771–5792, 19 out. 2017.

DAVIS, E. J. et al. Melanoma: What do all the mutations mean? **Cancer**, v. 124, n. 17, p. 3490, 9 set. 2018.

DE SOUZA, G. A. et al. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. **Proteomics**, v. 6, n. 5, p. 1460–1470, mar. 2006.

DING, L. et al. Prognostic biomarkers of cutaneous melanoma. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 38, n. 5, p. 418–434, set. 2022.

DOLAN, S. K. et al. Resistance is not futile: gliotoxin biosynthesis, functionality and utility. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 7, p. 419–428, 1 jul. 2015.

DU, D. et al. Smad3-mediated recruitment of the methyltransferase SETDB1/ESET controls Snail1 expression and epithelial-mesenchymal transition. **EMBO reports**, v. 19, n. 1, p. 135–155, jan. 2018.

DZWIERZYNSKI, W. W. Melanoma Risk Factors and Prevention. **Clinics in plastic surgery**, v. 48, n. 4, p. 543–550, 1 out. 2021.

EGGERMONT, A. M. M. et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 19, p. 1789–1801, 10 maio 2018.

EL SHAROUNI, M. A. et al. The progressive relationship between increasing Breslow thickness and decreasing survival is lost in patients with ultrathick melanomas ( $\geq 15$  mm in thickness). **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 87, n. 2, p. 298–305, 1 ago. 2022.

FALCHOOK, G. S. et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: a phase 1 dose-escalation trial. **The Lancet. Oncology**, v. 13, n. 8, p. 782–789, ago. 2012.

FALLETTA, P. et al. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. **Genes and Development**, v. 31, n. 1, p. 18–33, 1 jan. 2017.

FARDI, M. et al. The crucial role of ZEB2: From development to epithelial-to-mesenchymal transition and cancer complexity. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 9, p. 14783–14799, 1 set. 2019.

FILIMON, A. et al. Interleukin-8 in Melanoma Pathogenesis, Prognosis and Therapy-An Integrated View into Other Neoplasms and Chemokine Networks. **Cells**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2021.

FORTIER, A. M.; ASSELIN, E.; CADRIN, M. Keratin 8 and 18 Loss in Epithelial Cancer Cells Increases Collective Cell Migration and Cisplatin Sensitivity through Claudin1 Up-regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 16, p. 11555, 4 abr. 2013.

FURUTA, J. et al. Silencing of Peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas. **Cancer research**, v. 66, n. 12, p. 6080–6086, 15 jun. 2006.

GARDINER, D. M.; WARING, P.; HOWLETT, B. J. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. **Microbiology (Reading, England)**, v. 151, n. Pt 4, p. 1021–1032, abr. 2005.

GELMI, M. C. et al. MITF in Normal Melanocytes, Cutaneous and Uveal Melanoma: A Delicate Balance. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 11, 1 jun. 2022.

GODING, C. R.; ARNHEITER, H. Mitf—the first 25 years. **Genes and Development**, v. 33, n. 15–16, p. 983–1007, 1 ago. 2019.

GUZMÁN, C. et al. ColonyArea: an ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92444, 2014.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n.

5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HAO, L. et al. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. **The British journal of dermatology**, v. 166, n. 6, p. 1184–1197, jun. 2012.

HILL, D. S. et al. A Novel Fully Humanized 3D Skin Equivalent to Model Early Melanoma Invasion. **Molecular cancer therapeutics**, v. 14, n. 11, p. 2665–2673, 1 nov. 2015.

HINTSALA, H. R. et al. Dysregulation of redox-state-regulating enzymes in melanocytic skin tumours and the surrounding microenvironment. **Histopathology**, v. 67, n. 3, p. 348–357, 1 set. 2015.

HOEK, K. S.; GODING, C. R. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. **Pigment cell & melanoma research**, v. 23, n. 6, p. 746–759, dez. 2010.

HONG, S. H. et al. Silencing of peroxiredoxin II by promoter methylation is necessary for the survival and migration of gastric cancer cells. **Experimental & molecular medicine**, v. 50, n. 2, 2 fev. 2018.

HOOT, K. E. et al. Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 8, p. 2722–2732, 1 ago. 2008.

HUANG, F. et al. Melanoma Plasticity: Promoter of Metastasis and Resistance to Therapy. **Frontiers in oncology**, v. 11, 16 set. 2021.

HUBMANN, R. et al. Gliotoxin targets nuclear NOTCH2 in human solid tumor derived cell lines in vitro and inhibits melanoma growth in xenograft mouse model. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUL, 7 jul. 2017.

IARC WORKING GROUP ON RISK OF SKIN CANCER AND EXPOSURE TO ARTIFICIAL ULTRAVIOLET LIGHT.; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Exposure to Artificial UV Radiation and Skin Cancer**. [s.l.] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2006.

INCA. **Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. [s.l.: s.n.].

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Melanoma of skin ASR. **Global Cancer Observatory**, p. 1–2, 2019.

JIANG, W. et al. Berberine protects immortalized line of human melanocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress via activation of Nrf2 and Mitf signaling pathway. **Journal of dermatological science**, v. 94, n. 1, p. 236–243, 1 abr. 2019.

KANG, S. W. et al. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 12, p. 571, dez. 2005.

KANG, S. W.; LEE, S.; LEE, J. H. S. Cancer-Associated Function of 2-Cys Peroxiredoxin Subtypes as a Survival Gatekeeper. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 11, 2018.

KIM, K. et al. The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 10, p. 4704–4711, abr. 1988.

KIM, Y.; JANG, H. H. The Role of Peroxiredoxin Family in Cancer Signaling. **Journal of Cancer Prevention**, v. 24, n. 2, p. 65, 30 jun. 2019.

KIRKWOOD, J. M. et al. Phase II, open-label, randomized trial of the MEK1/2 inhibitor selumetinib as monotherapy versus temozolomide in patients with advanced melanoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 2, p. 555–567, 15 jan. 2012.

KUBOTA, D. et al. Proteomics study of open biopsy samples identifies peroxiredoxin 2 as a predictive biomarker of response to induction chemotherapy in osteosarcoma. **Journal of proteomics**, v. 91, p. 393–404, out. 2013.

LEBBÉ, C. et al. Selective Oral MEK1/2 Inhibitor Pimasertib in Metastatic Melanoma: Antitumor Activity in a Phase I, Dose-Escalation Trial. **Targeted oncology**, v. 16, n. 1, p. 47–57, 1 jan. 2021.

LEE, D. J. et al. Peroxiredoxin-2 represses melanoma metastasis by increasing E-cadherin/ $\beta$ -catenin complexes in adherens junctions. **Cancer Research**, v. 73, n. 15, p. 4744–4757, 1 ago. 2013.

LEE, T. H. et al. Inhibition of peroxiredoxin 2 suppresses Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in gastric cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 512, n. 2, p. 250–255, 30 abr. 2019.

LEE, W. et al. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 30, p. 22011–22022, 27 jul. 2007.

LEIKEIM, A. et al. A preclinical model of cutaneous melanoma based on reconstructed human epidermis. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International journal of oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 1 abr. 2018.

LI, J. et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 275, n. 5308, p. 1943–1947, 28 mar. 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LONG, G. V. et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 377, n. 19, p. 1813–1823, 9 nov. 2017.

LUKE, J. J. et al. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 14, n. 8, p. 463–482, 1 ago. 2017.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 6 jul. 2006.

MÜLLER, J. et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. **Nature communications**, v. 5, 2014.

MUÑOZ-COUSELO, E. et al. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. **OncoTargets and therapy**, v. 10, p. 3941–3947, 8 ago. 2017.

NA, Y. R. et al. Interleukin-6-induced Twist and N-cadherin enhance melanoma cell metastasis. **Melanoma research**, v. 23, n. 6, p. 434–443, dez. 2013.

NAIK, P. P. Role of Biomarkers in the Integrated Management of Melanoma. **Disease Markers**, v. 2021, p. 6238317, 2021.

NAPOLI, S. et al. Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma. **Cells**, v. 9, n. 5, maio 2020.

NEUMANN, C. A.; FANG, Q. Are peroxiredoxins tumor suppressors? **Current opinion in pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 375–380, ago. 2007.

NICOLUSSI, A. et al. The role of peroxiredoxins in cancer. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 6, n. 2, p. 139, fev. 2017.

PARK, J. et al. 2-Cys Peroxiredoxins: Emerging Hubs Determining Redox Dependency of Mammalian Signaling Networks. **International Journal of Cell Biology**, v. 2014, 2014.

PARK, Y. H. et al. Peroxiredoxin II promotes hepatic tumorigenesis through cooperation with Ras/Forkhead box M1 signaling pathway. **Oncogene**, v. 35, n. 27, p. 3503–3513, 7 jul. 2016.

PATTON, E. E. et al. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. **Current biology : CB**, v. 15, n. 3, p. 249–254, 8 fev. 2005.

PATTON, E. E. et al. Melanoma models for the next generation of therapies. **Cancer cell**, v. 39, n. 5, p. 610–631, 10 maio 2021.

PERKINS, A. et al. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. **Trends in biochemical sciences**, v. 40, n. 8, p. 435–445, 1 ago. 2015.

PESKIN, A. V.; WINTERBOURN, C. C. The Enigma of 2-Cys Peroxiredoxins: What Are Their Roles? **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 86, n. 1, p. 84–91, 1 jan. 2021.

**Proibido o uso estético de câmaras de bronzeamento — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa.** Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/anos-anteriores/proibido-o-uso-estetico-de-camaras-de-bronzeamento>>. Acesso em: 7 mar. 2023.

QUONG, R. Y. Y. et al. Protein kinases in normal and transformed melanocytes. **Melanoma research**, v. 4, n. 5, p. 313–319, 1994.

RAMBOW, F. et al. Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. **Cell**, v. 174, n. 4, p. 843–855.e19, 9 ago. 2018.

RAMBOW, F.; MARINE, J. C.; GODING, C. R. Melanoma plasticity and phenotypic diversity:

therapeutic barriers and opportunities. **Genes & development**, v. 33, n. 19–20, p. 1295–1318, 1 out. 2019a.

RAMBOW, F.; MARINE, J. C.; GODING, C. R. Melanoma plasticity and phenotypic diversity: therapeutic barriers and opportunities. **Genes & development**, v. 33, n. 19–20, p. 1295–1318, 1 out. 2019b.

RANDIC, T. et al. NRAS mutant melanoma: Towards better therapies. **Cancer treatment reviews**, v. 99, 1 set. 2021.

RIBATTI, D.; TAMMA, R.; ANNESE, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. **Translational oncology**, v. 13, n. 6, 1 jun. 2020.

RINALDUCCI, S. et al. Peroxiredoxin-2 as a candidate biomarker to test oxidative stress levels of stored red blood cells under blood bank conditions. **Transfusion**, v. 51, n. 7, p. 1439–1449, jul. 2011.

SATHYANARAYANAN, A.; CHANDRASEKARAN, K. S.; KARUNAGARAN, D. microRNA-145 modulates epithelial-mesenchymal transition and suppresses proliferation, migration and invasion by targeting SIP1 in human cervical cancer cells. **Cellular oncology (Dordrecht)**, v. 40, n. 2, p. 119–131, 1 abr. 2017.

SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. **Cellular and molecular biology of human melanoma. Cancer Biology and Therapy**, 2002.

SAÚDE, M. DA. **PORTARIA CONJUNTA Nº 19, de 25 de OUTUBRO de 2022.**

SCOLYER, R. A. et al. Melanoma pathology reporting and staging. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 33, n. Suppl 1, p. 15–24, 1 jan. 2020.

SENSI, M. et al. Human cutaneous melanomas lacking MITF and melanocyte differentiation antigens express a functional Axl receptor kinase. **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 12, p. 2448–2457, 2011.

SETH, R. et al. Systemic Therapy for Melanoma: ASCO Guideline. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 38, n. 33, p. 3947–3970, nov. 2020.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature reviews. Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 25 maio 2016.

SHAW, A. T. et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. **The New England journal of medicine**, v. 371, n. 21, p. 1963–1971, 20 nov. 2014.

SIEGEL MPH, R. L. et al. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 1 jan. 2023.

SINGH, H.; LONGO, D. L.; CHABNER, B. A. Improving Prospects for Targeting RAS. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 31, p. 3650–3659, 1 nov. 2015.

- SJOLANDER, A. et al. Association of p21<sup>ras</sup> with Phosphatidylinositol 3-Kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 18, p. 7908–7912, 11 mar. 1991.
- SOBOTTA, M. C. et al. Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. **Nature chemical biology**, v. 11, n. 1, p. 64–70, 1 jan. 2015.
- SOSA, M. S.; BRAGADO, P.; AGUIRRE-GHISO, J. A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 9, p. 611–622, 2014.
- SPADA, S. et al. Fibronectin as a multiregulatory molecule crucial in tumor matrisome: from structural and functional features to clinical practice in oncology. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 40, n. 1, 1 dez. 2021.
- STERNECK, E.; PORIA, D. K.; BALAMURUGAN, K. Slug and E-Cadherin: Stealth Accomplices? **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, 14 jul. 2020.
- SUN, D. et al. Differential expression patterns of capping protein, protein phosphatase 1 and casein kinase 1 may serve as diagnostic markers for malignant melanoma. **Melanoma research**, v. 21, n. 4, p. 335, ago. 2011.
- SUNDARARAJAN, V. et al. SNAI1 recruits HDAC1 to suppress SNAI2 transcription during epithelial to mesenchymal transition. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 5 jun. 2019.
- TEIXIDO, C. et al. Molecular Markers and Targets in Melanoma. **Cells**, v. 10, n. 9, 1 set. 2021.
- TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 7, p. 579–591, 2009.
- TSAO, H. et al. Melanoma: from mutations to medicine. **Genes & Development**, v. 26, n. 11, p. 1131, 6 jun. 2012.
- VAN ROY, F.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 23, p. 3756–3788, nov. 2008.
- VEAL, E. A. et al. Hyperoxidation of Peroxiredoxins: Gain or Loss of Function? **Antioxidants & redox signaling**, v. 28, n. 7, p. 574–590, 1 mar. 2018.
- WANG, J. et al. Targeting Reactive Oxygen Species Capacity of Tumor Cells with Repurposed Drug as an Anticancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.
- WARNE, P. H.; VICIAN, P. R.; DOWNWARD, J. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. **Nature**, v. 364, n. 6435, p. 352–355, 1993.
- WEBSTER, M. R.; KUGEL, C. H.; WEERARATNA, A. T. The Wnts of change: How Wnts regulate phenotype switching in melanoma. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1856, n. 2, p. 244–251, 1 dez. 2015.
- WESSELY, A. et al. How Neural Crest Transcription Factors Contribute to Melanoma Heterogeneity, Cellular Plasticity, and Treatment Resistance. **International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 5761**, v. 22, n. 11, p. 5761, 28 maio 2021.

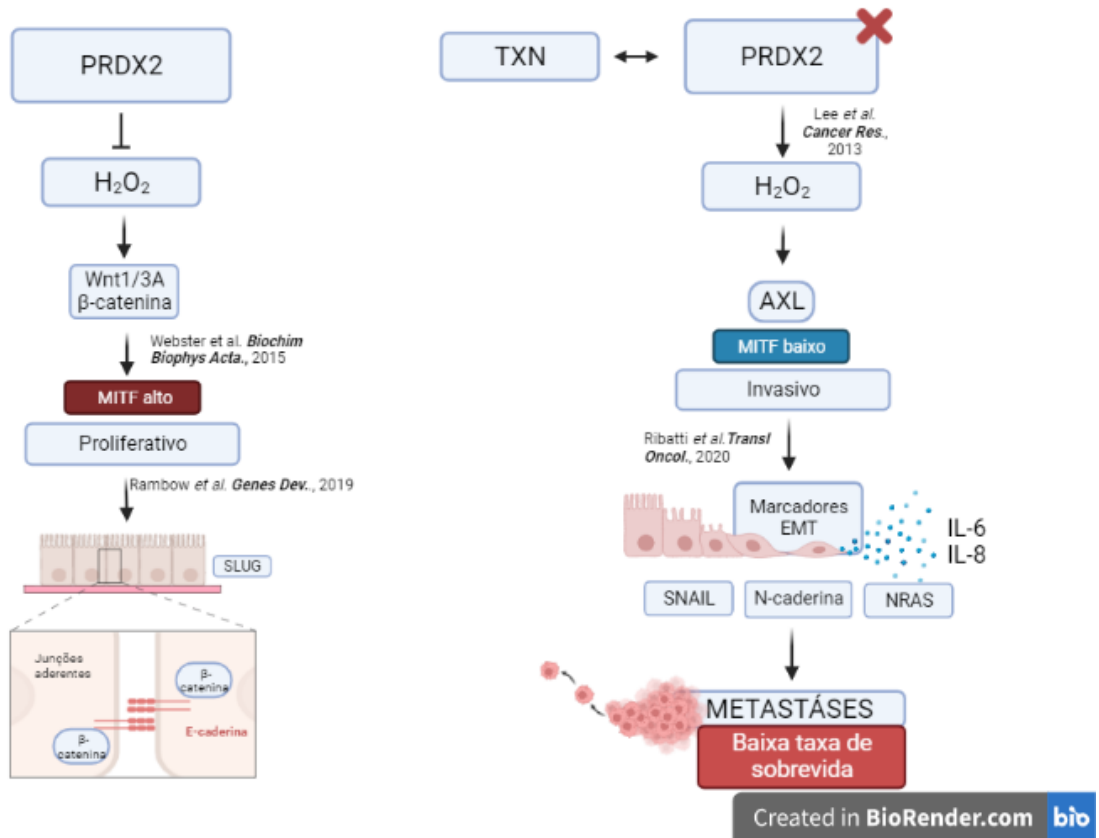
WOUTERS, J. et al. Single-cell gene regulatory network analysis reveals new melanoma cell states and transition trajectories during phenotype switching. **bioRxiv**, 2019.

ZIECH, D. et al. Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. **Mutation research**, v. 711, n. 1–2, p. 167–173, 3 jun. 2011.



## ANEXO A

Esquema ilustrativo resumindo o trabalho, utilizando o BioRender.



## ANEXO B

### Isabella Harumi Yonehara Noma

Curriculum Vitae

---

#### Nome civil

**Nome** Isabella Harumi Yonehara Noma

#### Dados pessoais

**Filiação** Edson Noma e Magda Yuriko Yonehara  
**Nascimento** 03/09/1996 - Maringá/PR - Brasil  
**Carteira de Identidade** 108737174 SESP - PR - 29/06/2006  
**CPF** 076.624.799-60  
**Passaporte** GF001610

**Endereço residencial** Rua Biágio Rivellino  
Vila Almeida - São Paulo  
04756150, SP - Brasil  
Telefone: 44 998976801  
Celular 44 998976801

#### Endereço eletrônico

E-mail para contato : bellanoma@hotmail.com  
E-mail alternativo isabellanoma70@gmail.com

---

#### Formação acadêmica/titulação

- 2020** Doutorado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: AVALIAÇÃO DA REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DE PEROXIRREDOXINA 2 NO CONTROLE DO CRESCIMENTO DE MELANOMAS NRAS MUTADOS  
Orientador: Silvy Stuchi Maria-Engler  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2018 - 2020** Mestrado em Ciências da Saúde.  
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil  
Título: Prevalência de Ureaplasmas e Micoplasmas em mulheres Maringenses em de idade fértil, Ano de obtenção: 2020  
Orientador: Marcia Edilaine Lopes Consolaro  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2019 - 2020** Especialização em Engenharia Biomédica com ênfase em engenharia clínica.  
Universidade Estácio de Sá, UNESA, Rio De Janeiro, Brasil  
Título: ANÁLISE GEOESPACIAL DE EQUIPAMENTOS DE DIAGNÓSTICO POR IMAGEM ASSOCIADO ÀS CARACTERÍSTICAS SÓCIODEMOGRÁFICAS NO BRASIL
- 2014 - 2017** Graduação em Biomedicina.  
Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil  
Título: Avaliação da resposta nociceptiva de camundongos infectados por Leishmania (Leishmania) amazonensis e a sua relação com o óxido nítrico

Orientador: Sandra Mara Alessi Aristides  
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2011 - 2013** Ensino Médio (2o grau) .  
 Colégio Santa Cruz, CSC, Brasil, Ano de obtenção: 2013

### **Formação complementar**

- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Saúde em dados: Como trabalhar com os sistemas do DataSUS. (Carga horária: 2h).  
 Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Introdução à Machine Learning. (Carga horária: 2h).  
 Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Língua Francesa A2- Paraná fala Francês- Modulo 2 Online. (Carga horária: 30h).  
 Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em I CURSO DE ONCOLOGIA BÁSICA DA LAOMA. (Carga horária: 10h).  
 Universidade de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em 1st International Digital Congress on 3D Biofabrication and Bioprinting. (Carga horária: 8h).  
 Universidade de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Introduction to the Biology of Cancer. (Carga horária: 8h).  
 Johns Hopkins University, JHU, Baltimore, Estados Unidos
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Revisão sistemática – Elementos essenciais para evidências confiáveis. (Carga horária: 2h).  
 Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Oral Communication and Academic Activities- Modalidade Online. (Carga horária: 35h).  
 Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Understanding Cancer Metastasis. (Carga horária: 4h).  
 Johns Hopkins University, JHU, Baltimore, Estados Unidos
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Cultivo celular e aplicações no estudo de doenças crônicas e infecciosas. (Carga horária: 15h).  
 Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em XI Board Review in Medical Oncology: Atualização, Discussão e Inovação e II. (Carga horária: 40h).  
 Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, IIEPAE, Sao Paulo, Brasil
- 2020 - 2020** Extensão universitária em Cursos a distância DES-UEM - Bioestatística Aplicada. (Carga horária: 34h).  
 Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil
- 2019 - 2019** Extensão universitária em Paraná fala francês A1- nível 2. (Carga horária: 60h).  
 Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringá, Brasil

<b>2019 - 2019</b>	Curso de curta duração em Conversation en langue française. (Carga horária: 8h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2019 - 2019</b>	Curso de curta duração em Descobrimdo fagos. (Carga horária: 15h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2019 - 2019</b>	Extensão universitária em Active Learning. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2019 - 2019</b>	Curso de curta duração em Vesículas extracelulares envolvidas em doenças crônicas e infecciosas. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2019 - 2019</b>	Extensão universitária em UEM na Expoingá. (Carga horária: 5h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2019 - 2019</b>	Primers: who are they and how to outline them?. Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil
<b>2019 - 2019</b>	Extensão universitária em I Curso de Férias em Imunologia e Imunogenética. (Carga horária: 40h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2018 - 2018</b>	Extensão universitária em Paraná fala Francês. (Carga horária: 60h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2018 - 2018</b>	Extensão universitária em Paraná fala Inglês. (Carga horária: 30h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2014 - 2016</b>	Língua japonesa. . (Carga horária: 300h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2016 - 2016</b>	Antibiotic as Promotors of Antibiotic Resistence.. . (Carga horária: 2h). Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, PBF, Brasil
<b>2015 - 2015</b>	Curso de curta duração em Perfusão Hepática in situ.. (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2015 - 2015</b>	Curso de curta duração em Estudos e Orientações para Exame de Proeficiência em Língua Japonesa N.05. (Carga horária: 12h). Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
<b>2014 - 2014</b>	Reprodução Assistida.. . (Carga horária: 4h). Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil

---

## Atuação profissional

### 1. Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

#### Vínculo institucional

**2018 - 2020** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estudante de pós-graduação , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva  
Outras informações:  
Mestrado no Programa de Ciências da Saúde - Bolsista

<b>2017 - 2017</b>	Vínculo: Estagiario , Enquadramento funcional: Estágio obrigatório em análises clínicas , Carga horária: 40, Regime: Integral
<b>2017 - 2017</b>	Vínculo: Estagiario , Enquadramento funcional: Estágio obrigatório em imunogenética , Carga horária: 40, Regime: Integral
<b>2015 - 2016</b>	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Monitor de microbiologia , Carga horária: 20, Regime: Parcial
<b>2014 - 2017</b>	Vínculo: Projeto Ensino , Enquadramento funcional: Práticas em laboratório , Carga horária: 4, Regime: Parcial

## 2. Universidade de São Paulo - USP

---

### Vínculo institucional

<b>2022 - 2022</b>	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiário em Docência , Carga horária: 6, Regime: Parcial
--------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------

---

### Projetos

#### Projetos de pesquisa

**2016 - 2016**      RELAÇÃO DA NOCICEPÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM ANIMAIS INFECTADOS COM LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Isabella Harumi Yonehara Noma; Paula Karoline Sfordi da Silva; Valéria Medrado Pereira; Sandra Mara Alessi Aristides ; Thais Gomes Verzignassi Silveira (Responsável)

**2016 - 2017**      Variabilidade de B-lactamase presentes em bacilos Gram negativos isolados durante a permanência de pacientes em Hospital Ensino

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Doutorado (1);

Integrantes: Isabella Harumi Yonehara Noma; Alessandra Barrochelli da Silva Ecker; Déborah de Castro Moreira; Maria Cristina Bronharo Tognim (Responsável)

#### Projeto de extensão

**2016 - 2016**      Integração estudantil na execução de ações voluntárias, visando uma maior divulgação e conscientização da comunidade maringaense sobre doenças pouco conhecidas que se manifestam na infância, distrofias musculares progressivas com ênfase na Dist. Muscular

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (13);

Integrantes: Isabella Harumi Yonehara Noma; Paula Karoline Sfordi da Silva; Tamires Leite Valverde ; Patrícia Alexandra da Silva Saavedra Romão; Natalia Mestre Braz ; Lais de Sena Marques; Maria Ida Bonini Ravanelli Speziali (Responsável); Fabiana Galvão da Motta Lima ; Francyhellen Franco Montanha; Gabriela Fernanda Martinez ; Maria Naomi Yamanaka; Sara Fabricio dos Santos; Aarão Fabrício dos Santos; Leonardo de Oliveira Figueiredo

**2016 - 2017**      Dr genética: conteúdo informacional online no auxílio a exames genéticos humanos

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (7);

Integrantes: Isabella Harumi Yonehara Noma; Tamires Leite Valverde ; Veronica Elisa Pimenta Vicentini ; Luiz Felipe MSB Blanco ; Lucas B Gremaschi; Patrícia Alexandra da Silva Saavedra Romão; Natalia

Mestre Braz ; Eliane Papa Ambrosio Albuquerque (Responsável)

---

## Áreas de atuação

1. Citologia Clínica
2. Fisiopatologia e diagnóstico laboratorial

---

## Idiomas

**Inglês** Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

---

## Prêmios e títulos

- 2022** Menção honrosa do trabalho intitulado “Targeting Peroxiredoxin-2 as a potential treatment for NRAS-mutated metastatic melanoma”, Universidade de São Paulo
- 2022** SMR PARTICIPATION AWARD, Society for Melanoma Research

---

## Produção

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. **NOMA, ISABELLA**; SHINOBU-MESQUITA, CRISTIANE; SUEHIRO, TAMY; MORELLI, FABRICIO; DE SOUZA, MARIA; DAMKE, EDILSON; DA SILVA, VÂNIA; CONSOLARO, MARCIA  
Association of High-Risk Human Papillomavirus and Ureaplasma parvum Co-Infections with Increased Risk of Low-Grade Squamous Intraepithelial Cervical Lesions. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. , v.22, p.1239 - 1246, 2021.
2. YUMI NORONHA, NATÁLIA; DA SILVA RODRIGUES, GUILHERME; **HARUMI YONEHARA NOMA, ISABELLA**; FERNANDA CUNHA BRANDAO, CAMILA; PEREIRA RODRIGUES, KARINE; COLELLO BRUNO, ALEXANDRE; SAE-LEE, CHANACHAI; MORIGUCHI WATANABE, LÍGIA; AUGUSTA DE SOUZA PINHEL, MARCELA; MELLO SCHINEIDER, ISABELLE; LUCIANO DE ALMEIDA, MARIANA; BARBOSA JÚNIOR, FERNANDO; ARAÚJO MORAIS, DÉBORAH; TAVARES DE SOUSA JÚNIOR, WELLINGTON; PLÖSCH, TORSTEN; ROBERTO BUENO JUNIOR, CARLOS; BARBOSA NONINO, CARLA  
14-weeks combined exercise epigenetically modulated 118 genes of menopausal women with prediabetes. Frontiers in Endocrinology. , v.13, p.895489 - , 2022.
3. NORONHA, NATÁLIA YUMI; DA SILVA RODRIGUES, GUILHERME; DE SOUZA PINHEL, MARCELA AUGUSTA; CAZIER, JEAN-BAPTISTE; WATANABE, LÍGIA MORIGUCHI; MENEZES, ALBERT NOBRE; BUENO, CARLOS ROBERTO; NICOLETTI, CAROLINA FERREIRA; DE OLIVEIRA, BRUNO AFFONSO PARENTI; SCHINEIDER, ISABELLE MELLO; **YONEHARA NOMA, ISABELLA HARUMI**; DIAS ALCARÁS, IGOR CAETANO; BARBOSA, FERNANDO; BARBOSA NONINO, CARLA  
Sample Preparation to Bioinformatics Analysis of DNA Methylation: Association Strategy for Obesity and Related Trait Studies. Jove-Journal of Visualized Experiments. , v.183, p.e62598 - , 2022.
4. SANTOS E SILVA, JUAN CARLO; VASCONCELOS, AMANDA PEREIRA; **YONEHARA NOMA, ISABELLA HARUMI**; NORONHA, NATÁLIA YUMI; AQUINO, RODRIGO; GIDDALURU, JEEVAN;

DURÃO, LUIZ; COSTA-MARTINS, ANDRÉ GUILHERME; SCHUCH, VIVIANE; MORAES-VIEIRA, PEDRO M.; NAKAYA, HELDER I.

Gene Signatures of Autopsy Lungs from Obese Patients with COVID-19. CLINICAL NUTRITION ESPEN. , v.43, p.986 - , 2021.

5. DOMINGUES, KARLA LARISSA TRASSI GANAZA; TANOSHI, CÍNTIA AKEMI; **NOMA, ISABELLA HARUMI YONEHARA**; CARVALHO, MARIA DALVA DE BARROS; PELLOSO, SANDRA MARISA; CONSOLARO, MARCIA EDILAINE LOPES; ARISTIDES, SANDRA MARA ALESSI; DEMARCHI, IZABEL GALHARDO; PEDROSO, RAISSA BOCCHI; LONARDONI, MARIA VALDRINEZ CAMPANA Economic impact of hospitalizations due to leishmaniasis in southern Brazil. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT. , v.11, p.e39211831139 - , 2022.

### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. RODRIGUES, R. F.; SILVA, L. L.; TANOSHI, C. A.; NOMA, I. H. Y.; SILVA, G. E. C. ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE ACIDENTES POR ANIMAIS PEÇONHENTOS NO ESTADO DO PARANÁ: NO PERÍODO DE 2015 A 2019 In: VII International Meeting of Biosciences and Physiopathology e XI Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia, 2020, Maringá.

**Anais do VII International Meeting of Biosciences and Physiopathology e XI Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia.** Maringá: Isabella Harumi Yonehara Noma, 2020. v.1.

2. TANOSHI, C. A.; NOMA, I. H. Y.; RODRIGUES, R. F.; SILVA, L. L.; ROSSONI, D. F.; PEDROSO, R. B.; ARISTIDES, S. M. A.

CHALLENGES TO HUMAN LEISHMANIASIS: DISCUSSION OF THE DISEASE BASED ON ITS BEHAVIOR In: III INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, 2019, Londrina.

**Annais III International Symposium os Experimental Pathology.** , 2019. p.40 -

3. NOMA, I. H. Y.; SUEHIRO, T. T.; MORELLI, F.; SOUZA, M. V. F.; MESQUITA, C. S. S.; SILVA, V. R. S.; CONSOLARO, M. E. L.

Co-infecções entre Papillomavirus Humano (HPV) e micoplasmas genitais em mulheres assintomáticas In: VI International Meeting of Biosciences and Physiopathology – X Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia, 2019, Ivatuba.

**Annais VI International Meeting of Biosciences & Physiopathology.** Maringá: , 2019. p.227 -

4. NOMA, I. H. Y.; TANOSHI, C. A.; SANTOS, D. S.; RODRIGUES, R. F.; SILVA, L. L.; CONSOLARO, M. E. L.; SOUZA, E. M.; PELLOSO, S. M.; PEDROSO, R. B.

THE PREVALENCE OF SYPHILIS IN PRENATAL CARE WOMEN IN PARANA STATE, BRAZIL In: III INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, 2019, Londrina.

**Annais III International Symposium os Experimental Pathology.** Londrina : UEL, 2019: Eduardo José de Almeida Araújo ...[et al.], 2019. p.48 -

5. NOMA, I. H. Y.; GANAZA, K. L. T.; TANOSHI, C. A.; DEMARCHI, I. G.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; CONSOLARO, M. E. L.

GASTOS PÚBLICOS NA MORBIDADE HOSPITALAR POR LEISHMANIOSE NO PARANÁ, BRASIL In: V International Meeting of Biosciences and Physiopathology e IX Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia., 2018, Maringá.

**Anais de Simpósio do Programa de Biociências e Fisiopatologia- UEM.** , 2018. v.1. p.175 -

6. NOMA, I. H. Y.; ECKER, A. B. S.; SZCZEREPKA, M. M. A.; TOGNIM, M. C. B.

Disseminação de enterobactérias em pacientes durante a internação em unidade de tratamento intensivo de hospital escola do sul do Brasil In: IV International Meeting of Biosciences and Physiopathology, 2017, Maringá.

**VII Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia.** , 2017.

7. SILVA, L. C.; PEREIRA, P. M.; DURANTE, P. C.; MATTOS, M. S. F.; ZERBINATI, H. T.; NOMA, I. H. Y.; FERNANDES, A. S.; CARDOSO, C. L.; TOGNIM, M. C. B.; NISHIYAMA, S. A. B.

PRELIMINARY EVALUATION OF THE FREQUENCY OF ACINETOBACTER BAUMANNI ISOLATE AT THE BUCAL AND NASAL CAVITY FROM UNIVERSITY STUDENTS In: 29° Congresso Brasileiro de

Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu.

**29º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2017.** , 2017.

8. MOREIRA, D. C.; ECKER, A. B. S.; NOMA, I. H. Y.; FEDRIGO, N. H.; FABRI, F. V.; COSTA, B. B.; ZERBINATI, H. T.; MENEZES, A. V.; FERNANDES, A. S.; TOGNIM, M. C. B.

SURVEILLANCE OF CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE IN PATIENTS DURING HOSPITALIZATION IN AN ADULT INTENSIVE CARE UNIT In: 29º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA - CBM, 2017, Foz do Iguaçu.

**29º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2017.** , 2017.

9. FEDRIGO, N. H.; MATTA, P. E. G.; PEREIRA, P. M.; NOMA, I. H. Y.; TOGNIM, M. C. B.

Atividade da fosfomicina contra *Acinetobacter baumannii* e desempenho de métodos de avaliação de sensibilidade In: VII Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia e III International Meeting of Biosciences and Physiopathology, 2016, Maringá.

**Anais Simpósio VII Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia.** , 2016.

10. NOMA, I. H. Y.; PEREIRA, V. M.; SILVA, P. K. S.; SANUKI, M. S.; SILVEIRA, T. G. V.; ARISTIDES, S. M. A.

RELAÇÃO DA NOCICEPÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM ANIMAIS INFECTADOS COM *Leishmania (Leishmania) amazonensis* In: IV Semana Acadêmica de Biomedicina - UEM, 2016, Maringá.

**Anais da IV Semana de Biomedicina.** , 2016.

11. VIANA, G. F.; ZAGO, M. C. B.; SAALFELD, S. M. S.; NOMA, I. H. Y.; MATTA, P. E. G.; MITSUGUI, C. S.; ABREU FILHO, B. A.; TOGNIM, M. C. B.

ALTERAÇÃO NO MODO DE DISSEMINAÇÃO DE ISOLADOS DE *Acinetobacter baumannii* EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO In: XIV Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2014, Curitiba.

**Journal of Infection Control.** , 2014. v.3. p.148 -

12. ZAGO, M. C. B.; VIANA, G. F.; SAALFELD, S. M. S.; NOMA, I. H. Y.; FARIAS, A. P. M.; HELBEL, C.; TOGNIM, M. C. B.

DISSEMINAÇÃO DE *Acinetobacter baumannii* EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE CONTROLE DE INFECÇÃO E EPIDEMIOLOGIA HOSPITALAR, 2014, Curitiba.

**DISSEMINAÇÃO DE *Acinetobacter baumannii* EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ.** , 2014. v.3. p.135 -

13. MATTA, P. E. G.; ECKER, A. B. S.; ZARPELLON, M. N.; MOREIRA, D. C.; NOMA, I. H. Y.; TAMURA, N. K.; GARCIA, L. B.; TOGNIM, M. C. B.

PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS NOS PRINCIPAIS BACIOS GRAM-NEGATIVOS ISOLADO SEM UM HOSPITAL DE ENSINO In: XIV Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2014, Curitiba.

**Journal of Infection Control.** , 2014. v.3. p.139 -

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. TANOSHI, C. A.; GANAZA, K. L. T.; NOMA, I. H. Y.; DEMARCHI, I. G.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; CONSOLARO, M. E. L.; LONARDONI, M. V. C.; ARISTIDES, S. M. A.

A prevalência de uma doença negligenciada: epidemiologia e morbidade das leishmanioses no Parana In: V International Meeting of Biosciences and Physiopathology e IX Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia., 2018, Maringá.

**Anais IX Semana Acadêmica de Biomedicina.** , 2018.

2. GANAZA, K. L. T.; TANOSHI, C. A.; NOMA, I. H. Y.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; CONSOLARO, M. E. L.; ARISTIDES, S. M. A.; DEMARCHI, I. G.; LONARDONI, M. V. C.

ANÁLISE DA MORBIDADE HOSPITALAR POR LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, 2008-2018 In: V Congresso Internacional do CCS, III Congresso Internacional de



Tratamento da Obesidade e VII Encontro do PCS. Universidade Estadual de Maringá, 2018, Maringá.  
**Anais V Congresso Internacional do CCS, III Congresso Internacional de Tratamento da Obesidade e VII Encontro do PCS.** , 2018.

3. TANOSHI, C. A.; NOMA, I. H. Y.; GANAZA, K. L. T.; DEMARCHI, I. G.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; LONARDONI, M. V. C.; CONSOLARO, M. E. L.; ARISTIDES, S. M. A.  
 DESPESAS EM MORBIDADE HOSPITALAR DEVIDO A LEISHMANIOSE VISCERAL EM UMA REGIÃO DO SUL DO BRASIL In: V Congresso Internacional do CCS, III Congresso Internacional de Tratamento da Obesidade e VII Encontro do PCS. Universidade Estadual de Maringá, 2018, Maringá.  
**Anais V Congresso Internacional do CCS, III Congresso Internacional de Tratamento da Obesidade e VII Encontro do PCS.** , 2018. p.5 -

4. NOMA, I. H. Y.; GANAZA, K. L. T.; TANOSHI, C. A.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; ARISTIDES, S. M. A.; DEMARCHI, I. G.; LONARDONI, M. V. C.; CONSOLARO, M. E. L.  
 LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA NO PARANÁ, AVALIAÇÃO DA MORBIDADE HOSPITALAR DE 2008 A 2018. In: V Congresso Internacional do CCS, III Congresso Internacional de Tratamento da Obesidade e VII Encontro do PCS. Universidade Estadual de Maringá, 2018, Maringá.  
**Anais V Congresso Internacional do CCS, III Congresso Internacional de Tratamento da Obesidade e VII Encontro do PCS.** , 2018. p.6 -

5. NOMA, I. H. Y.; ECKER, A. B. S.; MOREIRA, D. C.; SILVA, L. C.; PEREIRA, P. M.; SZCZEREPA, M. M. A.; TOGNIM, M. C. B.  
 VARIABILIDADE DE  $\beta$ -LACTAMASES PRESENTES EM BACILOS GRAM NEGATIVOS ISOLADOS DURANTE A PERMANÊNCIA DE PACIENTES EM HOSPITAL DE ENSINO In: 26.o Encontro Anual de Iniciação Científica e 6.o Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior, 2017, Maringá.  
**Anais XXVI EAIC VI EAIC Jr.** , 2017. p.67 -

6. ALBUQUERQUE, E. P. A.; MONTANHA, F. F.; NOMA, I. H. Y.; GREMASCHI, L. B.; BLANCO, L. F. M.; BRAZ, N. M.; ROMAO, P. A. S. S.; VALVERDE, T. L.; VICENTINI, V. E. P.  
 Dr. Genética: informação a serviço da comunidade In: Fórum de Extensão e Cultura da UEM Extensão Universitária: compromisso e transformação social, 2016, Maringá.  
**Anais do 14o Fórum de Extensão e Cultura da UEM : Extensão Universitária : compromisso e transformação social.** , 2016. v.23. p.13 - 16

7. NOMA, I. H. Y.; PEREIRA, V. M.; SANUKI, M. S.; BORGHI, S. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; SILVA, P. K. S.; ARISTIDES, S. M. A.  
 RELAÇÃO DA NOCICEPÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM ANIMAIS INFECTADOS COM LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS In: 25.o Encontro Anual de Iniciação Científica e 5.o Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior, 2016, Maringá.  
**Anais XXV EAIC V EAIC Jr.** , 2016. p.62 -

8. NOMA, I. H. Y.; WATANABE, A. S. M.; SILVA, M. R. T.; NEGRI, M. F. N.; BONFIM-MENDONCA, P. S.; COTICA, E. S. K.  
 Avaliação da patogenicidade e fatores de virulência de Candida albicans no modelo experimental de Candidemia In: III Semana Acadêmica de Biomedicina – UEM, 2015, Maringá.  
**ANAIS DA TERCEIRA SEMANA ACADÊMICA DE BIOMEDICINA.** , 2015.

9. SILVA, M. R. T.; WATANABE, A. S. M.; NOMA, I. H. Y.; NEGRI, M. F. N.; BONFIM-MENDONCA, P. S.; COTICA, E. S. K.  
 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PATOGENICIDADE DE CANDIDA ALBICANS APÓS CONTATOS SUBSEQUENTES COM O HOSPEDEIRO In: III Semana Acadêmica de Biomedicina – UEM, 2015, Maringá.  
**ANAIS DA TERCEIRA SEMANA ACADÊMICA DE BIOMEDICINA.** , 2015.

10. WATANABE, A. S. M.; SILVA, M. R. T.; NOMA, I. H. Y.; NEGRI, M. F. N.; BONFIM-MENDONCA, P. S.; COTICA, E. S. K.  
 AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE CANDIDA TROPICALIS APÓS CANDIDEMIA EXPERIMENTAL In: III Semana Acadêmica de Biomedicina – UEM, 2015, Maringá.

**ANAIS DA TERCEIRA SEMANA ACADÊMICA DE BIOMEDICINA. , 2015.**

**Apresentação de trabalho e palestra**

1. RODRIGUES, R. F.; SILVA, L. L.; TANOSHI, C. A.; NOMA, I. H. Y.; SILVA, G. E. C.  
**ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE ESCORPIONISMO NOS ESTADOS DO SUL DO BRASIL: UM ESTUDO REFERENTE AO PERÍODO DE 2015 A 2019**, 2020. (Outra, Apresentação de Trabalho)
2. NOMA, I. H. Y.; CRUZ, E.; DUTRA, A. C.; NEGRI, M. F. N.  
**Geospatial Analysis of Diagnostic Imaging Equipment in Brazil**, 2020. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
3. CRUZ, E.; NOMA, I. H. Y.; DUTRA, A. C.; NEGRI, M. F. N.  
**Life-Sustaining Equipment: A Demographic Geospace Analysis in National Territory**, 2020. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
4. TANOSHI, C. A.; NOMA, I. H. Y.; RODRIGUES, R. F.; SILVA, L. L.; PEDROSO, R. B.; ARISTIDES, S. M. A.  
**Challenges to human leishmaniasis: discussion of the disease based on its behavior**, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
5. NOMA, I. H. Y.; SUEHIRO, T. T.; MORELLI, F.; SOUZA, M. V. F.; MESQUITA, C. S. S.; SILVA, V. R. S.; CONSOLARO, M. E. L.  
**Co-infecções entre Papillomavirus Humano (HPV) e micoplasmas genitais em mulheres assintomáticas**, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
6. NOMA, I. H. Y.; TANOSHI, C. A.; RODRIGUES, R. F.; SILVA, L. L.; CONSOLARO, M. E. L.; PEDROSO, R. B.  
**The prevalence of syphilis in prenatal care women in Paraná State, Brazil**, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
7. TANOSHI, C. A.; GANAZA, K. L. T.; NOMA, I. H. Y.; DEMARCHI, I. G.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; CONSOLARO, M. E. L.; LONARDONI, M. V. C.; ARISTIDES, S. M. A.  
**A prevalência de uma doença infecciosa negligenciada: epidemiologia e morbidade das leishmanioses no Paraná. 2018**, 2018. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
8. GANAZA, K. L. T.; TANOSHI, C. A.; NOMA, I. H. Y.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; CONSOLARO, M. E. L.; ARISTIDES, S. M. A.; DEMARCHI, I. G.; LONARDONI, M. V. C.  
**Análise da morbidade hospitalar por leishmaniose cutânea no estado do Paraná, Brasil, 2008-2018**, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
9. TANOSHI, C. A.; NOMA, I. H. Y.; GANAZA, K. L. T.; DEMARCHI, I. G.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; LONARDONI, M. V. C.; CONSOLARO, M. E. L.; ARISTIDES, S. M. A.  
**Despesas em morbidade hospitalar devido a leishmaniose visceral em uma região do sul do Brasil.**, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
10. NOMA, I. H. Y.; GANAZA, K. L. T.; TANOSHI, C. A.; DEMARCHI, I. G.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; CONSOLARO, M. E. L.  
**GASTOS PÚBLICOS NA MORBIDADE HOSPITALAR POR LEISHMANIOSE NO PARANÁ, BRASIL**, 2018. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
11. NOMA, I. H. Y.; GANAZA, K. L. T.; TANOSHI, C. A.; PEDROSO, R. B.; CARVALHO, M. D. B.; PELLOSO, S. M.; ARISTIDES, S. M. A.; DEMARCHI, I. G.; LONARDONI, M. V. C.; CONSOLARO, M. E. L.  
**Leishmaniose mucocutânea no Paraná, avaliação da morbidade hospitalar de 2008 a 2018.**, 2018. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

12. PEREIRA, P. M.; MATTA, P. E. G.; NOMA, I. H. Y.; SILVA, L. C.; FARIAS, A. P. M.; ZARPELLON, M. N.; TOGNIM, M. C. B.

**ATIVIDADE DE FOSFOMICINA CONTRA ISOLADOS DE ACINETOBACTER BAUMANNII: AVALIAÇÃO DE DIFERENTES METODOLOGIAS**, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

13. NOMA, I. H. Y.; ECKER, A. B. S.; SZCZEREPA, M. M. A.; TOGNIM, M. C. B.

**Disseminação de enterobactérias em pacientes durante a internação em unidade de tratamento intensivo de hospital escola do sul do Brasil.**, 2017. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

14. SILVA, L. C.; PEREIRA, P. M.; DURANTE, P. C.; MATTOS, M. S. F.; ZERBINATI, H. T.; NOMA, I. H. Y.; FERNANDES, A. S.; CARDOSO, C. L.; TOGNIM, M. C. B.; NISHIYAMA, S. A. B.

**PRELIMINARY EVALUATION OF THE FREQUENCY OF ACINETOBACTER BAUMANNI ISOLATE AT THE BUCAL AND NASAL CAVITY FROM UNIVERSITY STUDENTS**, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

15. MOREIRA, D. C.; ECKER, A. B. S.; NOMA, I. H. Y.; FEDRIGO, N. H.; FABRI, F. V.; COSTA, B. B.; ZERBINATI, H. T.; MENEZES, A. V.; FERNANDES, A. S.; TOGNIM, M. C. B.

**SURVEILLANCE OF CARBAPENEM-RESISTANT ENTEROBACTERIACEAE IN PATIENTS DURING HOSPITALIZATION IN AN ADULT INTENSIVE CARE UNIT.**, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

16. ECKER, A. B. S.; MOREIRA, D. C.; NOMA, I. H. Y.; VIANA, G. F.; MITSUGUI, C. S.; PEREIRA, P. M.; TOGNIM, M. C. B.

**VARIABILIDADE CLONAL E PESQUISA DE GENES DE BETA LACTAMASES DE ACINETOBACTER BAUMANNII ISOLADOS DURANTE A PERMANÊNCIA DE PACIENTES EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA**, 2017. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

17. NOMA, I. H. Y.; ECKER, A. B. S.; MOREIRA, D. C.; SILVA, L. C.; PEREIRA, P. M.; SZCZEREPA, M. M. A.; TOGNIM, M. C. B.

**VARIABILIDADE DE  $\beta$ -LACTAMASES PRESENTES EM BACILOS GRAM NEGATIVOS ISOLADOS DURANTE A PERMANÊNCIA DE PACIENTES EM HOSPITAL DE ENSINO**, 2017. (Outra,Apresentação de Trabalho)

18. FEDRIGO, N. H.; MATTA, P. E. G.; PEREIRA, V. M.; NOMA, I. H. Y.; TOGNIM, M. C. B.

**Atividade da fosfomicina contra Acinetobacter baumannii e desempenho de métodos de avaliação de sensibilidade**, 2016. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

19. ROMAO, P. A. S. S.; ALBUQUERQUE, E. P. A.; MONTANHA, F. F.; NOMA, I. H. Y.; GREMASCHI, L. B.; BLANCO, L. F. M.; BRAZ, N. M.; VALVERDE, T. L.; VICENTINI, V. E. P.

**Dr. Genética: Conteúdo informacional online de apoio a exames genéticos**, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)

20. NOMA, I. H. Y.; PEREIRA, V. M.; SANUKI, M. S.; BORGHI, S. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; SILVA, P. K. S.; ARISTIDES, S. M. A.

**RELAÇÃO DA NOCICEPÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM ANIMAIS INFECTADOS COM LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS**, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)

21. FEDRIGO, N. H.; TREVIZOLI, T. M. B.; NOMA, I. H. Y.; MITSUGUI, C. S.; AOKI, E. E.; TAMANINI, J. B.; TOGNIM, M. C. B.

**Análise temporal da resistência aos carbapenêmicos em bacilos gram-negativos não fermentadores**, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

22. NOMA, I. H. Y.; WATANABE, A. S. M.; SILVA, M. R. T.; NEGRI, M. F. N.; BONFIM-MENDONCA, P. S.; COTICA, E. S. K.

**Avaliação da patogenicidade e fatores de virulência de Candida albicans no modelo experimental de Candidemia**, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)

23. SILVA, M. R. T.; WATANABE, A. S. M.; NOMA, I. H. Y.; NEGRI, M. F. N.; BONFIM-MENDONCA, P. S.; COTICA, E. S. K.

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PATOGENICIDADE DE CANDIDA ALBICANS APÓS CONTATOS SUBSEQUENTES COM O HOSPEDEIRO**, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)

24. WATANABE, A. S. M.; SILVA, M. R. T.; NOMA, I. H. Y.; NEGRI, M. F. N.; BONFIM-MENDONCA, P. S.; COTICA, E. S. K.

**AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE CANDIDA TROPICALIS APÓS CANDIDEMIA EXPERIMENTAL**, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)

25. LODI, F. G.; ZAGO, M. C. B.; MATTA, P. E. G.; NOMA, I. H. Y.; TAMURA, N. K.; AOKI, E. E.; TOGNIM, M. C. B.

**Evolução temporal da concentração inibitória mínima para daptomicina em cocos gram-positivos**, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

26. VIANA, G. F.; ZAGO, M. C. B.; SAALFELD, S. M. S.; NOMA, I. H. Y.; MATTA, P. E. G.; MITSUGUI, C. S.; ABREU FILHO, B. A.; TOGNIM, M. C. B.

**ALTERAÇÃO NO MODO DE DISSEMINAÇÃO DE ISOLADOS DE Acinetobacter baumannii EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

27. ZAGO, M. C. B.; VIANA, G. F.; SAALFELD, S. M. S.; NOMA, I. H. Y.; FARIAS, A. P. M.; HELBEL, C.; TOGNIM, M. C. B.

**DISSEMINAÇÃO DE Acinetobacter baumannii EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO NA REGIÃO NORTE DO PARANÁ**, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

28. MATTA, P. E. G.; ECKER, A. B. S.; ZARPELLON, M. N.; MOREIRA, D. C.; NOMA, I. H. Y.; TAMURA, N. K.; GARCIA, L. B.; TOGNIM, M. C. B.

**PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS NOS PRINCIPAIS BACILOS GRAM-NEGATIVOS ISOLADO SEM UM HOSPITAL DE ENSINO.**, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

## Produção técnica

### Redes sociais, websites, blogs

1. NOMA, I. H. Y.

**É POSSÍVEL RECRIAR PELE ENVELHECIDA IN VITRO?**, 2020

## Eventos

### Eventos

#### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **19th International Congress of the Society for Melanoma Research**, 2022. (Congresso)

PRDX2 as a possible phenotype switcher in NRAS-mutated melanomas.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Simpósio em comemoração dos 50 anos do Programa de Pós Graduação em Farmácia Fisiopatologia e Toxicologia**, 2022. (Simpósio)

Targeting Peroxiredoxin 2 as a potential treatment for NRAS mutated metastatic melanoma.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXII Brazilian Congress of Toxicology**, 2022. (Congresso)

Gliotoxin and its potential cytotoxicity against NRAS mutated-melanoma.

4. **A importância do estudo de Irritação/Corrosão Dérmica in vitro na avaliação toxicológica**, 2021. (Outra)

.

5. **Host-Pathogen Interaction Meeting**, 2021. (Encontro)

- .
6. **I Simpósio Desafios em Oncologia Molecular**, 2021. (Simpósio)
- .
7. **Brazilian Congress in Biomedical Engineering (CBEB2020)**, 2020. (Congresso)  
GEOSPATIAL ANALYSIS OF DIAGNOSTIC IMAGING EQUIPMENT IN BRAZIL.
8. **Ciclo de Palestras FisiTox**, 2020. (Seminário)
- .
9. **Congresso Acadêmico Unifesp Virtual 2020 - Ciência e Universidade: Transformações para a Sociedade**, 2020. (Congresso)
- .
10. **II Encontro De Genética, Hemoterapia e Patologias Hematológicas**, 2020. (Encontro)
- .
11. **Increasing CRISPR editing efficiency with novel guide RNA methods**, 2020. (Seminário)
- .
12. **Infecção por HPV- Infecto em Série**, 2020. (Seminário)
- .
13. **Perspectivas Diagnósticas e Terapêuticas utilizando a Tecnologia CRISPR**, 2020. (Outra)
- .
14. **PÍLULAS DE ONCOLOGIA - Casos clínicos em oncologia: aplicação de conceitos básicos**, 2020. (Seminário)
- .
15. **PÍLULAS DE ONCOLOGIA: Princípios de hormonioterapia no tratamento oncológico**, 2020. (Seminário)
- .
16. **PÍLULAS DE ONCOLOGIA: Princípios do Tratamento Oncológico e Mecanismos da Quimioterapia**, 2020. (Seminário)
- .
17. **PÍLULAS DE ONCOLOGIA: Terapia-alvo e Imunoterapia na Oncologia Moderna**, 2020. (Seminário)
- .
18. **VII International Meeting of Biosciences and Physiopathology e XI Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia**, 2020. (Simpósio)
- .
19. **Festival Varilux-UEM de Cinema Francês 2019**, 2019. (Exposição)
- .
20. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY**, 2019. (Simpósio)  
THE PREVALENCE OF SYPHILIS IN PRENATAL CARE WOMEN IN PARANA STATE, BRAZIL.
21. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VI International Meeting of Biosciences and Physiopathology – X Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia**, 2019. (Encontro)  
Co-infecções entre Papillomavirus Humano (HPV) e micoplasmas genitais em mulheres assintomáticas.
22. **8.o Encontro Anual de Iniciação Tecnológica e Inovação**, 2018. (Encontro)

Coordenador(a) de sessão.

23. **II Workshop Brasil-Estados Unidos em câncer cervical**, 2018. (Outra)

.

24. **O SUS e a Saúde Pública brasileira: cenário atual e perspectivas**, 2018. (Outra)

.

25. Apresentação Oral no(a) **V Congresso Internacional do CCS, III Congresso Internacional de Tratamento da Obesidade e VII Encontro do PCS. Universidade Estadual de Maringá**, 2018. (Congresso)

Leishmaniose mucocutânea no Paraná, avaliação da morbidade hospitalar de 2008 a 2018.

26. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V International Meeting of Biosciences and Physiopathology e IX Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia.**, 2018. (Simpósio)  
GASTOS PÚBLICOS NA MORBIDADE HOSPITALAR POR LEISHMANIOSE NO PARANÁ, BRASIL.

27. **Vamos falar sobre Doenças Raras?**, 2018. (Outra)

.

28. **26.o Encontro Anual de Iniciação Científica e 6.o Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior**, 2017. (Encontro)

VARIABILIDADE DE  $\beta$ -LACTAMASES PRESENTES EM BACILOS GRAM NEGATIVOS ISOLADOS DURANTE A PERMANÊNCIA DE PACIENTES EM HOSPITAL DE ENSINO.

29. **I Workshop de genética médica**, 2017. (Outra)

.

30. **25.o Encontro Anual de Iniciação Científica e 5.o Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior**, 2016. (Encontro)

RELAÇÃO DA NOCICEPÇÃO COM A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM ANIMAIS INFECTADOS COM LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS.

31. **I Simpósio Regional de Fisiologia Integrativa e do Exercício**, 2016. (Simpósio)

.

32. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IV Semana Acadêmica de Biomedicina - UEM**, 2016. (Outra)

Relação da nocicepção com a produção de óxido nítrico em animais infectados com Leishmania (Leishmania) amazonenses.

33. **PROSED**, 2016. (Oficina)

Projeto Socioeducacional da III Semana Acadêmica de Biomedicina - UEM.

34. **Conexão Saúde**, 2015. (Outra)

.

35. **III Semana Acadêmica de Biomedicina – UEM**, 2015. (Outra)

Avaliação da patogenicidade e fatores de virulência de Candida albicans no modelo experimental de Candidemia.

36. **4º Congresso Paranaense de Ciências Biomédicas e 1ª Oficina Pró-saúde**, 2014. (Congresso)

.

37. **II Semana Acadêmica de Biomedicina - UEM**, 2014. (Outra)

.

38. **III Mostra de Cinema e Divulgação Científica em Biociências**, 2014. (Outra)

.

39. **I Fórum de Discussão Estudantil, 2011.** (Outra)  
Fontes alternativas de energia (biodiesel e biogás).

### Organização de evento

1. **NOMA, ISABELLA HARUMI YONEHARA**

**II Ciclo de Palestra da FisiTox, do Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia), 2021.** (Outro, Organização de evento)

2. **NOMA, I. H. Y.**

**VII International Meeting of Biosciences and Physiopathology e XI Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia, 2020.** (Outro, Organização de evento)

3. **NOMA, I. H. Y.**

**VI International Meeting of Biosciences and Physiopathology – X Simpósio de Biociências Aplicadas à Farmácia, 2019.** (Outro, Organização de evento)

---

## Totais de produção

### Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	5
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	23
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra).....	2
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	12
Apresentações de trabalhos (Simpósio).....	7
Apresentações de trabalhos (Outra).....	7

### Produção técnica

Rede Social.....	1
------------------	---

### Eventos

Participações em eventos (congresso).....	6
Participações em eventos (seminário).....	7
Participações em eventos (simpósio).....	6
Participações em eventos (oficina).....	1
Participações em eventos (encontro).....	6
Participações em eventos (outra).....	12
Organização de evento (outro).....	3

## ANEXO C

13/03/2023, 23:37

about:blank

Janus



---

**9142 - 11963986/1 - Isabella Harumi Yonehara Noma**

**Email:** isabellanoma@usp.br  
**Data de Nascimento:** 03/09/1996  
**Cédula de Identidade:** RG - 10.873.717-4 - PR  
**Local de Nascimento:** Estado do Paraná  
**Nacionalidade:** Brasileira  
**Graduação:** Bacharela em Biomedicina - Universidade Estadual de Maringá - Paraná - Brasil - 2018  
**Mestrado:** Mestre em Ciências da Saúde (1) - Universidade Estadual de Maringá - Paraná - Brasil - 2020

---

**Curso:** Doutorado  
**Programa:** Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)  
**Área:** Fisiopatologia  
**Data de Matrícula:** 14/04/2020  
**Início da Contagem de Prazo:** 14/04/2020  
**Data Limite para o Depósito:** 09/04/2025  
**Orientador:** Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria Engler - 14/04/2020 até o presente. Email: silvy@usp.br  
**Proficiência em Línguas:** Inglês, 14/04/2020  
**Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** Aprovado em 23/05/2022

**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 14/04/2020  
Mudança de Nível/Curso em 11/08/2021

---

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 30/01/2023

**Impresso em:** 13/03/2023 23:37:18





**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

**FICHA DO ALUNO**

**9142 - 11963986/1 - Isabella Harumi Yonehara Noma**

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ICR5702-11/2	Bases Moleculares das Funções Celulares (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	10/08/2020	18/10/2020	150	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FRF5805-3/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/08/2020	19/10/2020	90	6	100	A	N	Concluída
RMH5749-10/5	Tópicos Avançados em Biologia Celular e Tecidual II (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/08/2020	20/10/2020	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5793-14/4	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	14/08/2020	26/11/2020	15	1	90	A	N	Concluída
RRP5792-1/2	Mecanismos Moleculares do Câncer (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	28/09/2020	18/10/2020	45	3	100	A	N	Concluída
MCM5851-5/3	Biologia Celular do Câncer (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	20/10/2020	21/12/2020	90	6	100	B	N	Concluída
FBC5789-4/1	Fisiopatologia, Química Farmacêutica e Farmacologia Integrada do Câncer	01/02/2021	21/02/2021	90	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5789-8/6	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	23/03/2021	05/07/2021	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5789-4/2	Fisiopatologia, Química Farmacêutica e Farmacologia Integrada do Câncer	05/04/2021	25/04/2021	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5783-2/1	Toxicocinética – Mecanismos envolvidos na toxicidade de xenobióticos	03/05/2021	30/05/2021	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5792-5/6	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	12/08/2021	24/11/2021	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5956-1/5	Atualização e Revisão de Modelos de Pele	09/02/2022	15/02/2022	30	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5766-7/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia IV	01/04/2022	14/07/2022	15	1	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
<b>Disciplinas:</b>	0	20	29
<b>Estágios:</b>			
<b>Total:</b>	0	20	29

**Créditos Atribuídos à Tese: 167**

**Observações:**

1) Curso com validade nacional de acordo com o disposto na Portaria MEC Nº 609, de 14/03/2019

**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 30/01/2023

**Impresso em:** 13/03/2023 23:37:18