

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

Avaliação do papel da Pentraxina 3 na biologia de células tumorais humanas

ALUNO: João Paulo Silva Nunes

ORIENTADORA: Dra. Adriana Abalen Martins Dias

BELO HORIZONTE

Fevereiro de 2018

JOÃO PAULO SILVA NUNES

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE PENTRAXINA 3 NA BIOLOGIA DE
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética.

Área de concentração:

Genética Molecular, de Microrganismos e
Biotecnologia

Orientadora:

Prof. Dra. Adriana Abalen Martins Dias

Belo Horizonte

Fevereiro de 2018

043 Nunes, João Paulo Silva.
Avaliação do papel de pentraxina 3 na biologia de células tumorais humanas
[manuscrito] / João Paulo Silva Nunes. - 2018.

174 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Adriana Abalen Martins Dias.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas.

1. Genética - Teses. 2. Carcinogênese. 3. Melanoma. 4. Sarcoma. 5.
Adenocarcinoma. I. Dias, Adriana Abalen Martins. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



ATA DA DEFESA DE TESE

João Paulo Silva Nunes

100/2018
entrada
1º/2014
CPF:
020.753.283-40

Às nove horas do dia **26 de fevereiro de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Avaliação do papel da Pentraxina 3 na biologia de células tumorais humanas**", requisito para obtenção do grau de Doutor em **Genética**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Adriana Abalen Martins Dias- Orientadora**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Adriana Abalen Martins Dias- Orientadora	UFMG	544099346-00	APROVADO
Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima	Clínica do Hospital do Câncer AC Camargo - SP	930641384-34	REPROVADO
Renata Toscano Simões	Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa- BH	381157002-15	Aprovado
Álvaro Cantini Nunes	UFMG	678159606-34	APROVADO
Lucíola da Silva Barcelos	UFMG	032738896-08	APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2018.

Adriana Abalen Martins Dias- Orientadora

Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Renata Toscano Simões

Álvaro Cantini Nunes

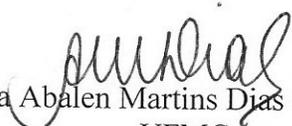
Lucíola da Silva Barcelos



"Avaliação do papel da Pentraxina 3 na biologia de células tumorais humanas"

João Paulo Silva Nunes

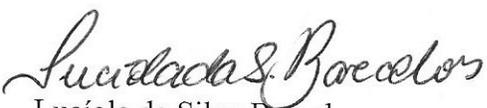
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Adriana Abalen Martins Dias - Orientadora
UFMG


Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima
Clínica do Hospital do Câncer AC Camargo - SP


Renata Toscano Simões
Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa- BH


Alvaro Cantini Nunes
UFMG


Lucíola da Silva Barcelos
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre sonharam com o sucesso da minha carreira, que nunca desistiram de acreditar em mim e por sempre me apoiarem com muito amor, entusiasmo e compreensão!

AGRADECIMENTOS

Feliz sou eu por ter tido tantas pessoas que me ajudaram nesse trabalho.

Quero inicialmente agradecer aos meus pais, Jeferson da Costa Nunes e Neusa Araújo Silva Nunes, a quem dedico todo esse trabalho, pela minha criação, pelo desenvolvimento humano, pelos apoios contínuos, por sempre acreditarem que minha vinda a Belo Horizonte e todo o esforço despendido durante o período do doutoramento foi importante para meu crescimento profissional e, que apesar de todos os problemas e injustiças que é fazer pós-graduação no Brasil, nunca perderam a fé em mim. Agradeço também às minhas irmãs Juliana Jéssica Silva Nunes e Bárbara Silva Nunes por terem que conviver na ausência do irmão, acreditando que as escolhas que fiz foram as melhores e por sempre me receberem com muita alegria nas poucas visitas que consegui fazer. Agradeço também à minha avó Carminha, aos meus irmãos Jecimar, Lígia, Lívia, Lícia, Jeilson, Jemilson e Jenilson, primos, tios, e toda família, pela torcida nessa caminhada solo que resolvi encarar.

É claro que quero agradecer a pessoa mais importante para mim em Belo Horizonte, a senhorita Joyce Esposito de Souza. Graças a ela conheci pessoas muito especiais como a Jacqueline Esposito, Antônio Magela e Amanda Esposito que me acolheram de braços abertos e por me aceitarem como um novo membro da família! Graças a ela a minha vivência durante o doutorado foi mais humana, amorosa e suportável. Graças a ela me tornei um homem mais maduro e mais paciente com a vida em sociedade. Graças a ela despertei o amor. Muito obrigado, Joyce ^J_J♥!!

Quero agradecer aos meus padrinhos Francisco Monteiro e Maria das Graças por me receberem com muita felicidade na sua casa, me dando suporte e tornando a minha vida mais fácil quando precisei fazer experimentos em São Paulo.

Agradeço muito à minha orientadora Adriana Abalen Martins Dias, que me recebeu no mestrado e no doutorado, que dedicou seu tempo, intelectualidade e paciência para polir meu perfil científico, não medindo esforços em me ajudar a ser um profissional mais preparado para os desafios do mercado!

Agradeço a todos os membros da equipe LGEX, em especial a Priscila Fabiana Rodrigues e Flávia Ivair Santiago de Oliveira que me acompanharam desde o mestrado e que sempre me ajudaram nas discussões, nas padronizações de experimentos, no dia-a-dia, na revisão desta tese e nos *happy hours*. Agradeço também aos alunos Ana Flávia e Victor Moura, pela ajuda na reta final do doutorado e para os quais deixo a continuidade do meu projeto.

À equipe da Itália, em especial às pesquisadoras Cecilia Garlanda e Barbara Bottazzi, da *Fondazione Humanitas per la Ricerca*, por nos terem cedido a proteína PTX3 recombinante, à Jay Morgenstern e Hartmut Land pela construção dos plasmídeos e ao Roberto Ronca da *Università degli Studi di Brescia* pela doação dos plasmídeos, cujas colaborações viabilizaram a realização do trabalho.

Aos professores do laboratório de Vírus Erna Geessien, Paulo César Ferreira, Cláudio Bonjardim, Giliane Trindade, Jonatas Abrahão e Betânia Paiva Drumond e às alunas Andrea, Carol, Lorena e Paula que nos cederam a infraestrutura para cultivo celular. Em especial ao aluno Leonardo Camilo de Oliveira pela colaboração nos experimentos de transfecção celular.

À equipe do Laboratório de Genética de Populações (Genepop) e Laboratório de Diversidade Genética Humana (LDGH), professores Maria Bernadete, Eduardo Tarazona, Renata Buzatti e ao Fillipe Luiz Rosa do Carmo (Laboratório de Genética Celular e Molecular) por terem me ajudado na transformação das bactérias.

Aos pesquisadores Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira da UFMG, Edécio Cunha Neto e seus alunos Almir, Ricardo e Aritânia do Laboratório de Imunologia e Alergia do Instituto do Coração pela receptividade em São Paulo e pela ajuda nos experimentos de micro-RNA.

Ao Raphael Steinberg do Instituto Federal do Espírito Santo pelo auxílio nos experimentos de padronização da análise de expressão gênica em tempo real e treinamento no uso do termociclador ABI 7900HT.

Às professoras Gleide de Avelar, Carolina Cavarieli e às alunas Núbia Braga e Juliana Cristina (UFMG) pela ajuda nos cuidados dos camundongos no biotério.

À professora Elaine de Souza Fagundes e ao doutorando Jonas Pereira do Departamento de Fisiologia e Biofísica e à técnica Daniela Reis do Centro de Citometria da UFMG pelo treinamento no uso dos equipamentos BD FACScan e FACSCalibur.

Ao professor Dawidson Gomes e à técnica Nayara do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI / UFMG) pelo treinamento no uso dos equipamentos de microscopia confocal LSM 510 Meta e de fluorescência Apotome.2.

À professora Luciana Andrade e aluna Luísa pela ajuda nos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis (Hospital Sírio-Libanês) pela doação das células não neoplásicas de fibroblasto GM-637.

Aos professores Eduardo Tarazona, Ana Lúcia (2014-16) e Evanguedes Kalapothakis e Adriana Abalen (2017-) pela coordenação do programa de pós-graduação e às secretárias Raíssa Fernandes Lima Campos e Daniela pela assistência sempre solícita.

Aos pesquisadores Álvaro Cantini Nunes, Lucíola da Silva Barcelos, Renata Toscano Simões, Vladimir Cordeiro de Lima, Renata Alvarenga Bottrel, e Frederico Soriani por gentilmente aceitarem contribuir e fazer parte da minha banca de defesa desta tese.

APOIO INSTITUCIONAL E FINANCIAMENTO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Experimental (LGEX) do Departamento de Biologia Geral, com o apoio do Programa de Pós-graduação em Genética, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG), e com os seguintes fomentos:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES);

Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq/UFMG).

*“ O sucesso é ir de fracasso em fracasso...
... sem perder o entusiasmo ”*

Winston Leonard Spencer-Churchill

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	i
Lista de imagens	vii
Lista de tabelas	xi
Lista de equações	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. Introdução	14
1.1. Família das Pentraxinas	14
1.2. Pentraxina 3: gene, estrutura proteica e funções biológicas	19
1.2.1. Funções na resposta imune inata e inflamação	24
1.2.2. Funções na remodelação tecidual e fertilidade feminina	26
1.2.3. PTX3 como biomarcador de patologias	27
1.3. Interação entre PTX3 e membros da família FGF	30
1.4. O processo tumorigênico	34
2. Justificativa e relevância	40
3. Objetivos	42
3.1. Geral	42
3.2. Específicos	42
4. Material e métodos	43
4.1. Delineamento experimental	43
4.2. Proteína PTX3 recombinante humana.....	44
4.3. Linhagens de células tumorais humanas.....	44
4.4. Expansão e criopreservação das linhagens de células tumorais humanas..	45
4.5. Monitoramento da contaminação por Micoplasma	47

4.5.1. Extração de DNA	47
4.5.2. PCR duplex para identificação de micoplasma e descontaminação de linhagens contaminadas	48
4.6. Avaliação do tempo de duplicação e da taxa de proliferação celular	50
4.7. Ensaio de Migração celular (<i>scratch assay</i>)	52
4.8. Crescimento independente de ancoragem	53
4.9. Análise da expressão gênica (mRNA)	54
4.9.1. Construção dos iniciadores	54
4.9.2. Extração de RNA total.....	57
4.9.3. Transcrição reversa	58
4.9.4. PCR em Tempo Real – SYBR Green	58
4.10. Análise da expressão de micro-RNAs	60
4.10.1. Extração e quantificação de RNA total.....	60
4.10.2. Análise da integridade do RNA total pelo Bioanalyzer	62
4.10.3. Transcrição reversa	63
4.10.4. PCR em tempo real - TaqMan	65
4.11. Obtenção das células de melanoma humano expressando PTX3	65
4.11.1. Plasmídeos	65
4.11.2. Confirmação da presença do inserto de PTX3 nas bactérias transformadas	68
4.11.3. Extração do DNA plasmidial (midi-prep)	68
4.11.4. Confirmação das construções por análise de restrição, PCR e sequenciamento.....	70
4.11.5. Transfecção das células de melanoma humano	71
4.11.6. Proliferação celular das células transfectadas	72
4.12. Xenotransplante experimental	73
4.13. Análises estatísticas	75

5. Resultados	76
5.1. Tempo de duplicação das de células tumorais	76
5.2. Avaliação do perfil de expressão gênica basal de FGF2 e PTX3.....	78
5.3. Efeito da rhPTX3 sobre a proliferação das células tumorais	79
5.4. Efeito de rhPTX3 sobre a taxa de migração celular	82
5.5. Análise da ação de rhPTX3 sobre o crescimento independente de ancoragem nas colônias de células de melanoma humano	85
5.6. Análise da expressão gênica (mRNA).....	88
5.6.1. Desenho dos iniciadores.....	88
5.6.2. Análise da expressão gênica	90
5.7. Análise da expressão de miRNA	100
5.8. Obtenção de linhagens transfectadas estáveis	105
5.8.1. Análise da proliferação das células de melanoma transfectadas.....	111
5.9. Efeito da PTX3 no xenoenxerto tumoral	113
6. Discussão	117
7. Resumo dos resultados	133
8. Conclusão	136
9. Perspectivas	137
10. Referências	139
ANEXOS	152
ANEXO I. Aprovação pelo comitê de ética	152
ANEXO II. Estrutura do <i>backbone</i> de pBABE/Puro.....	154
APÊNDICES	155
APÊNDICE 1. Análise da contaminação por micoplasma das linhagens de células humanas.....	155
APÊNDICE 2. Curva de amplificação, curva padrão e curva de dissociação otimizadas para PTX3.....	156

APÊNDICE 3. Estruturas secundárias dos iniciadores para amplificação de PTX3 e FGF2 por PCR em tempo real	157
APÊNDICE 4. Bactérias transformadas com os plasmídeos pBABE/Puro mock e PTX3.....	158
APÊNDICE 5. Iniciadores desenhados para análise da transição EMT, ciclo celular e vias MAPK e AKT	159
APÊNDICE 6. Curva de morte das células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 com puromicina	160
APÊNDICE 7. miRNAs e os diferentes tipos cânceres	161
APÊNDICE 8. Produção científica relacionada à tese	163
Artigo em preparação	163
Artigo publicado	164
Resumos.....	169
APÊNDICE 9. Colaboração em outros projetos de pesquisa.....	170
APÊNDICE 10. Co-orientações de alunos de Iniciação Científica	172
APÊNDICE 11. Premiação.....	173
APÊNDICE 12. Participação em eventos científicos no período.....	174

Lista de abreviaturas

Sigla e símbolos	Definição
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
aa	Aminoácido
ABI	Applied BioSystems
ACTB	Actina beta
AKT1	Homólogo 1 de oncogene viral V-akt de timoma murino
ANOVA	Análise de variância
AP	Via alternativa
AP	Proteína ativadora
AP1	Proteína ativadora 1
AP2	Proteína ativadora 2
ATCC	American Type Culture Collection
AVC	Acidente vascular cerebral
BAD	Promotor de morte celular associado a BCL-2
BAX	Proteína X associada a BCL-2
BCL-2	Linfoma 2 de células B
BCS	Índice de condição corpórea
BLAST	Ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico
bp	Par de bases
BrEt	Brometo de etídio
BSA	Albumina de soro bovino
C-	Extremidade carboxi terminal
C4BP	Proteína de ligação a C4b
CCND1	Ciclina D1
CCNG1	Ciclina G1
CD	Grupamento de diferenciação
CDH	Caderina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHO	Ovário de hamster chinês
ChoP	Fosforilcolina
cM	Comprimento mapeado

CO₂	Dióxido de carbono
CP	Via clássica
CRP	Proteína C reativa
C_T	Limiar do ciclo
Da	Dalton
DAPI	Cloridrato de 4',6-diamindino-2-fenilindol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DHT	Dihidrotestosterona
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos tri fosfatados
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FBS	Soro fetal bovino
FE	Fosfoetanolamina
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGF2	Fator de crescimento de fibroblasto tipo 2
FGFBP	Proteína de ligação a fator de crescimento de fibroblasto
FGFR	Receptor de fator de crescimento de fibroblasto
FH	Fator H
FHF	Fator homólogo a FGF
FOS	Homólogo de oncogene viral de osteosarcoma murino FBJ
FOXC2	Proteína C2 da caixa Forkhead
FOXP1	Proteína N1 da caixa Forkhead
FRS2A	Substrato 2 do receptor de fator de crescimento de fibroblasto
GAB1	Proteína de ligação 1 associada a GRB2
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GAS	Sequência ativada de interferon-gama
GCA	Arterite temporal

GJA	Proteína de junções gap
GPR	Receptor acoplado à proteína G
GRB2	Fator de crescimento ligado ao receptor 2
H1N1	Hemaglutinina tipo 1 e Neuraminidase tipo 1
H3	Histona H3
H3N2	Hemaglutinina tipo 3 e Neuraminidase tipo 2
HA	Hialuronano viscoelástico
HCl	Ácido clorídrico
HCT	Tumor de cólon humano
HIF	Fator induzido por hipóxia
HIGH	Alta expressão gênica
HPRT1	Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase
hsa	Homo sapiens
HSP	Proteína de choque térmico
HSPG	Proteoglicanos de sulfato de heparana
HT	Tumor Humano
iFGF	FGF intracelular
IFNG	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IKBKG	Modulador essencial do fator nuclear- <i>kappa</i> -B
IL	Interleucina
IL1B	Interleucina 1, beta
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
IUGR	Restrição de crescimento intrauterino
IαI	Inibidor inter- α -tripsina
kDa	Quilo Dalton
LAL	Ensaio de lisado de amebócitos Limulus
LB	Luria Bertani
LGEX	Laboratório de Genética Experimental
LOW	Baixa expressão gênica
LP	Via da lectina
LPS	Lipopolissacarídeo
LTR	Repetição terminal longa
M	Molar

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MBL	Lectina de ligação a manose
MCS	Sítio de clonagem múltipla
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MID	Expressão gênica mediana
miR	micro-RNA
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Mieloma múltiplo
MMC	Mitomicina C
MMLV	Retrovírus-gama da leucemia murina de Moloney
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Metil-tiazol Tetrazólio
MYC	Homólogo do oncogene viral de mielocitomatose aviária V-myc
N-	Extremidade amino terminal
N₂	Nitrogênio líquido
NaCl	Cloreto de sódio
NAD(P)-H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaN₃	Azida sódica
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF	Neurofibromina
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NFκB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NOD	Diabético não obeso
NP1	Pentraxina neural 1
NP2	Pentraxina neural 2
NPTXR	Receptor de pentraxina neural
NRQ	Expressão relativa normalizada
NULL	Não expresso
OmpA	Proteína A da membrana externa
PAMP	Moléculas padrões associadas a patógenos

PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PC	Fosfocolina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pDNA	Ácido desoxirribonucleico plasmidial
PE	Pré-eclâmpsia
PFA	Paraformaldeído
PGN	PBS contendo 0,25% gelatina e 0,1% NaN ₃
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PIP₃	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato
PLCY1	Fosfolipase C γ 1
PPD	p-fenilenodiamina
PRM	Moléculas de reconhecimento de padrões
PSA	Antígeno prostático específico
PTEN	Fosfatase e tensina homólogo
PTX3	Pentraxina 3
PTX4	Pentraxina 4
q.s.p	Quantidade suficiente para
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RB	Proteína associada a retinoblastoma
rhPTX3	Pentraxina 3 recombinante humana
RIN	Número de integridade do RNA
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT	Transcriptase reversa
RT	Transcrição reversa
RTK	Receptor tirosina quinase
S.E.M	Erro padrão da média
SAP	Componente amilóide P do soro
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SCID	Imunodeficiência combinada severa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel SDS-poliacrilamida
SK-MEL	Melanoma do Instituto Sloan-Kettering

SNAI	Proteína zing finger SNAI
snoRNA	RNA pequeno nuclear
SP1	Proteína de especificidade 1
SPF	Livre de patógeno específico
ST13	Supressão da tumorigenicidade
STK11	Serina/treonina 11-quinase
SV-40	Vírus simian 40
SVEP1	Sushi, fator de von Willebrand tipo A, contendo EGF e domínio de pentraxina
T_A	Temperatura de anelamento
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris acetato EDTA
TLDA	TaqMan Low Density Array
TLR	Receptor do tipo Toll
T_M	Temperatura de melting
TMA	Microarranjo de tecidos
TME	Microambiente tumoral
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa
TP53	Proteína tumoral p53
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSG	Gene estimulado por TNFA
TSG14	Gene 14 induzido por TNF
TSS	Sítio de início de transcrição
U	Unidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	Volt
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor de fator de crescimento endotelial vascular
WT	Tipo selvagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro
\bar{X}	Média

Lista de imagens

Figura 1. Representação esquemática da regulação do sistema complemento pelas pentraxinas.....	15
Figura 2. Proteínas que compõem a família das Pentraxinas	17
Figura 3. Estrutura do gene PTX3 em humanos e camundongos.....	21
Figura 4. Estrutura proteica proposta para PTX3.....	22
Figura 5. Sinalização mediada pelo sistema FGF/FGFR	33
Figura 6. Esquema das vias RAS/RAF-MEK-MAPK e PI3K-AKT em melanoma.....	39
Figura 7. Fluxograma representativo do delineamento experimental da avaliação do efeito de PTX3 em células tumorais humanas.	43
Figura 8. Aspecto dos cristais de formazan aprisionados dentro das células viáveis de melanoma.....	51
Figura 9. Análise do tempo de duplicação das linhagens de células humanas cultivadas <i>in vitro</i>	77
Figura 10. Análise da expressão gênica basal de FGF2 e PTX3 nas linhagens tumorais humanas.....	79
Figura 11. Análise do efeito do tratamento com a rhPTX3 sobre a proliferação das células de melanoma SK-Mel-188 e SK-Mel-37.....	80
Figura 12. Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 sobre a proliferação celular da linhagem HT-1080.....	81
Figura 13. Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 sobre a proliferação celular da linhagem HCT-116.	81
Figura 14. Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 sobre a proliferação celular da linhagem GM637.....	82

Figura 15. Efeito de rhPTX3 na migração das células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188	84
Figura 16. Efeito de rhPTX3 na migração das células de fibrossarcoma HT-1080 ...	85
Figura 17. Efeito da proteína rhPTX3 no crescimento independente de ancoragem de colônias das células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188	87
Figura 18. Análise da integridade do RNA total extraído das células tratadas com rhPTX3.	92
Figura 19. Avaliação da qualidade da transcrição reversa utilizando iniciadores para NOTCH2.....	93
Figura 20. Modulação da expressão gênica por rhPTX3 na linhagem celular HT-1080 de fibrossarcoma.....	95
Figura 21. Análise do efeito de rhPTX3 sobre o perfil de expressão gênica nas células HCT-116.....	96
Figura 22. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de SK-Mel-188.....	97
Figura 23. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de SK-Mel-37.....	98
Figura 24. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de SK-Mel-37 (replicata 02 e 03)	99
Figura 25. Integridade do RNA total da linhagem de melanoma SK-Mel-37 para análise de miRNA.....	101
Figura 26. Integridade do RNA total da linhagem de melanoma SK-Mel-188 para análise de miRNA.....	102
Figura 27. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão de miRNAs nas linhagens de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188.....	103
Figura 28. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão dos miR-188 e miR-149 nas linhagens de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188.....	104

Figura 29. Confirmação, por PCR, dos clones de bactérias transformadas com os plasmídeos pBABE_mock e pBABE_PTX3	107
Figura 30. Análise de restrição e por PCR para confirmação dos plasmídeos obtidos por mid-prep a partir dos clones 5_mock e 4_PTX3 das bactérias transformadas .	108
Figura 31. Aspectos morfológicos das células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 transfectadas com os plasmídeos pBABE_mock e pBABE_PTX3.	110
Figura 32. Análise da expressão gênica nas células de melanoma transfectadas .	111
Figura 33. Análise da proliferação das células de melanoma transfectadas com PTX3	112
Figura 34. Análise do volume do tumor proveniente de xenoinxerto de células SK-Mel-37 transfectadas	114
Figura 35. Aspecto externo dos melanomas de 42 dias induzidos em camundongos BALB/c nude.	115
Figura 36. Aspecto dos tumores de 42 dias extraídos dos camundongos BALB/c nude inoculados com células de melanoma.....	116
Figura 37. Representação proposta do envolvimento de PTX3 nas vias de sinalização relacionadas a progressão do melanoma.....	135
Figura 38. Estrutura do <i>backbone</i> do plasmídeo pBABE_mock.....	154
Figura 39. Análise da contaminação por micoplasma nas células humanas	155
Figura 40. Condições otimizadas dos iniciadores de PTX3 para PCR em tempo real	156
Figura 41. Estruturas secundárias (<i>hairpins</i>) possíveis de serem formadas nos iniciadores para PTX3 e FGF2.	157
Figura 42. Clones de bactérias TOP10 transformadas com os plasmídeos pBABE_mock e pBABE_PTX3.....	158

Figura 43. Análise da curva de morte das células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 em resposta a puromicina160

Lista de tabelas

Tabela 1. Características dos membros da família das Pentraxinas	19
Tabela 2. Especificidade de ligantes de CRP, SAP e PTX3	23
Tabela 3. Características das linhagens de células tumorais humanas utilizadas. ...	45
Tabela 4. Critérios utilizados para a construção dos iniciadores.....	55
Tabela 5. Lista dos miRNAs maduros candidatos.....	64
Tabela 6. Características do genótipo das bactérias <i>E. coli</i> TOP10.....	67
Tabela 7. Lista dos iniciadores desenhados para RT- PCR em tempo real.	89
Tabela 8. Condições otimizadas dos iniciadores para RT-PCR em tempo real	90
Tabela 9. Aspectos quantitativos e qualitativos do RNA total extraído das células tratadas com rhPTX3.	91
Tabela 10. Quantificação dos pDNAs extraídos dos clones 4_PTX3 e 5_mock	107
Tabela 11. <i>Uptake</i> dos tumores nos camundongos inoculados com células de melanoma transfectadas com PTX3 (SK-Mel-37 pBABE_PTX3) ou com o vetor vazio (SK-Mel-37 pBABE_mock).....	115
Tabela 12. Iniciadores desenhados para avaliar o efeito de PTX3 na transição epitélio-mesenquimal, ciclo celular e vias MAPK e AKT	159
Tabela 13. miRNAs em diferentes tipos de câncer e funções associadas	161

Lista de equações

Equação 1. Cálculo de eficiência de amplificação.....	59
Equação 2. Cálculo para expressão relativa normalizada utilizando três genes calibradores.....	59
Equação 3. Cálculo de células viáveis utilizando Azul de Tripan.	74

Resumo

NUNES, JPS. **Avaliação do papel de Pentraxina 3 na biologia de células tumorais humanas**. Belo Horizonte; 2018 [Tese de doutorado].

O melanoma é um tipo de câncer caracterizado por uma transformação maligna de melanócitos. Dentre os fatores envolvidos na progressão de melanomas estão a ativação constitutiva de vias de sinalização como PI3K-AKT, mudanças no perfil de expressão de proto-oncogenes, micro-RNAs, e expressão aumentada de fatores pró-proliferativos e pró-angiogênicos. Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) são moléculas-chave na progressão tumoral por promoverem proliferação celular e angiogênese através da interação com receptores tirosina quinase (FGFR). A pentraxina longa PTX3 interage com FGF2, inibindo as ações pró-tumorais induzidas por esse fator. Portanto, PTX3 pode vir a ser uma ferramenta terapêutica promissora no retardamento da progressão de diversos tumores, inclusive melanomas. Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito biológico da proteína PTX3 humana recombinante (rhPTX3) sobre características biológicas importantes para a progressão tumoral em linhagens celulares que expressam constitutivamente FGF2 e FGFR4 derivadas de tumores humanos de fibrossarcoma (HT-1080), adenocarcinoma colorretal (HCT-116) e melanoma maligno (SK-Mel-37 e SK-Mel-188). Nossos dados mostraram que o tratamento com rhPTX3 inibiu a proliferação celular, o crescimento de colônias celulares independente de ancoragem e a migração celular dos melanomas SK-Mel-188 e SK-Mel-37. Análises de expressão gênica por RT-qPCR mostraram que PTX3 também modulou a expressão dos genes FGF2, FGF2BP e FGFR4 e retardou o crescimento de melanomas induzidos pela inoculação de células SK-Mel-37 super-expressando PTX3. Dados preliminares mostram que PTX3 pode modular a expressão dos microRNAs miR-149 e o miR-188 associados a progressão de melanomas. Nossos dados sugerem que a PTX3 interfere em características importantes das células tumorais que podem comprometer a progressão de melanomas, contudo, seu potencial como biomarcador de progressão tumoral ou mesmo seu uso na terapia deste tipo de malignidade precisa ser mais estudado. **Palavras chave:** PTX3, FGF2, tumorigênese, melanoma, sarcoma, adenocarcinoma de cólon, câncer

Abstract

NUNES, JPS. **Evaluation of the role of Pentraxin 3 in the biology of human tumor cells.** Belo Horizonte; 2018 [PhD thesis].

Melanoma is a type of cancer characterized by malignant transformation of melanocytes. Different types of molecular factors have been depicted as being important for melanoma progression, such as overexpression of pro-proliferative factors (VEGFA, EGF), changes in the expression of proto-oncogenes and microRNAs related to melanoma progression and constitutive activation of signaling pathways such as PI3K-AKT. Fibroblast growth factors (FGF) are key molecules in tumor progression by promoting cell proliferation and angiogenesis through interaction with receptor tyrosine kinases (FGFRs). The long pentraxin PTX3 interacts with FGF2, inhibiting the pro-tumor actions induced by this factor. Therefore, PTX3 is a promising therapeutic tool in delaying the progression of several tumors, including melanomas. This study aimed to investigate the biological effect of recombinant human PTX3 protein (rhPTX3) on important biological traits for tumor progression in cell lines constitutively expressing FGF2 and FGFR4 derived from human fibrosarcoma tumors (HT-1080), colorectal adenocarcinoma (HCT-116) and malignant melanoma (SK-Mel-37 and SK-Mel-188). Our data showed that treatment with rhPTX3 inhibited cell proliferation, cell colonies formation ability and cell migration of SK-Mel-188 and SK-Mel-37 melanomas. Analyzes of gene expression by RT-qPCR showed that PTX3 also modulated the expression of FGF2, FGFBP and FGFR4 and that *in vivo* tumorigenesis of PTX3-transfected SK-Mel-37 cells was inhibited. Preliminary data show that PTX3 can modulate the expression of microRNAs associated with melanomas progression, such as miR-149 and miR-188. Our data suggest that PTX3 interferes in important tumor cell characteristics that may compromise the progression of melanomas, however, its potential as a tumor progression biomarker or even its use in the therapy of this type of malignancy needs to be further studied. **Key words:** PTX3, FGF2, tumorigenesis, melanoma, sarcoma, adenocarcinoma colorectal, cancer

1. Introdução

1.1. Família das Pentraxinas

As Pentraxinas formam uma superfamília de proteínas filogeneticamente conservadas de aracnídeos até mamíferos e que apresentam propriedades multifuncionais. Estas proteínas são consideradas como ancestrais funcionais dos anticorpos, funcionando como moléculas de reconhecimento de padrões (PRM) sendo componentes essenciais do braço humoral da resposta imune inata (Garlanda *et al.*, 2006). As pentraxinas possuem uma vasta gama de funções essenciais na resposta imunológica humoral, tais como o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*), atividade de opsonização, discriminação de antígenos próprios e não próprios, ativação e regulação das três vias do complemento (clássica, lectina e alternativa) (Figura 1), como também funções na fertilidade feminina, reparo tecidual e angiogênese (Agrawal *et al.*, 2009; Vilahur e Badimon, 2015). Estruturalmente, todos os membros desta família possuem um domínio carboxi-terminal (C-terminal) peculiar de aproximadamente 200 aminoácidos, no qual é possível identificar um motivo conservado de oito resíduos descrito como a assinatura dessa família HxCxS/TWxS (Histidina, x, Cisteína, x, Serina ou Treonina, x, Triptofano, x, Serina; x é qualquer outro aminoácido) (Garlanda *et al.*, 2006; Martinez De La Torre *et al.*, 2010). As proteínas dessa família são proteínas de fase fluida e a concentração das pentraxinas na circulação sanguínea ou em tecidos aumenta rapidamente em condições inflamatórias com forte correlação com a severidade da condição clínica (Daigo *et al.*, 2016) sendo, portanto, consideradas proteínas de fase aguda.

Etimologicamente, o nome Pentraxina foi atribuído a essa família pela estrutura pentamérica circular simétrica da proteína C reativa (CRP), que foi a primeira pentraxina identificada no plasma sanguíneo (Gewurz *et al.*, 1995; Mantovani *et al.*, 2013; Daigo *et al.*, 2016). Com o passar dos anos e a identificação de novos membros, a família das pentraxinas foi subdividida nas classes das pentraxinas curtas e longas com base, principalmente, na estrutura primária do protômero proteico (Figura 2) (Bottazzi *et al.*, 1997). A proteína C reativa (CRP) e a proteína amiloide P do soro (SAP) são os protótipos das pentraxinas curtas e

constituem, respectivamente, as principais proteínas de fase aguda em humanos e camundongos (Inforzato, Bottazzi, *et al.*, 2012).

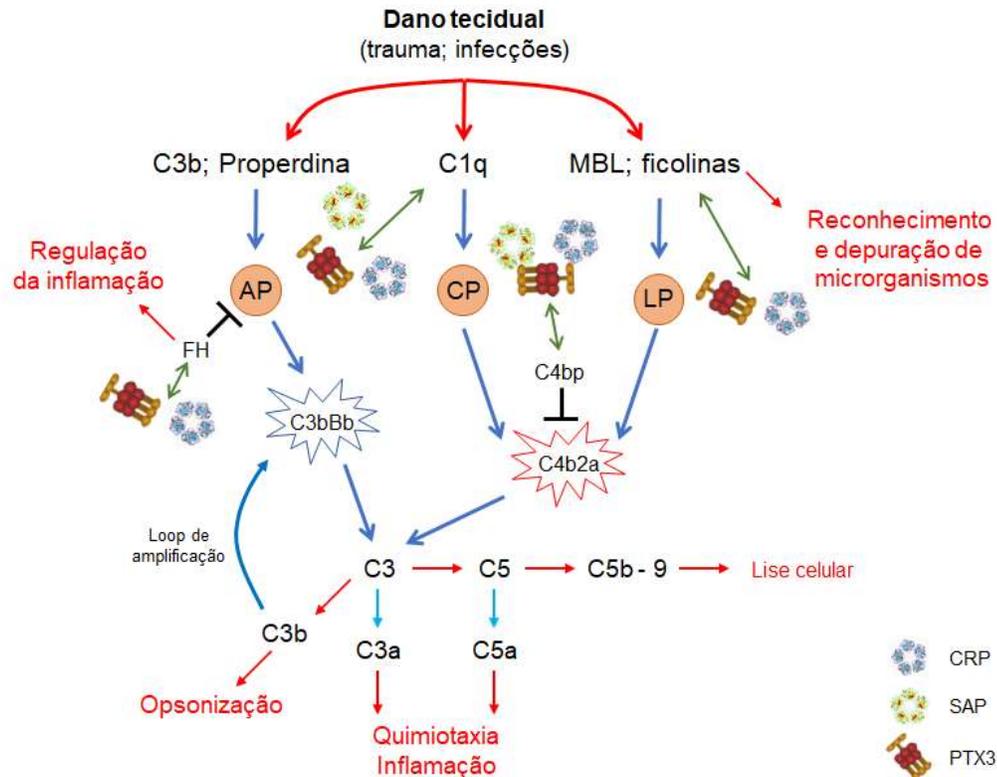


Figura 1. Representação esquemática da regulação do sistema complemento pelas pentraxinas.

As pentraxinas PTX3, CRP e SAP interagem com as moléculas do sistema complemento. A ativação do complemento se dá pelo reconhecimento de motivos moleculares conservados presentes na superfície de microrganismos (PAMPs). A via da lectina (LP) é ativada pela interação de MBL (Lectina de ligação a manose) e ficolinas com os carboidratos presentes na superfície celular dos microrganismos. Anticorpos específicos se ligam aos microrganismos formando sítios de ligação para C1q ativando a cascata da via clássica do complemento (CP). As proteínas C3 e properdina podem ativar a via alternativa (AP) quando imobilizadas na superfície celular de patógenos. A ativação destas três vias desencadeia uma cascata de eventos que resulta em opsonização, recrutamento de leucócitos e lise celular, etapas essenciais para a remoção do microrganismo. A formação da C3 convertase (C4b2a para CP e LP e C3bBb para AP) é a primeira etapa necessária para ativação da hidrólise de C3, formando C3a, C3b e C5a, com formação subsequente de C5b-9, o complexo que desencadeia a lise celular. PTX3, CRP e SAP se ligam a C1q, regulando a cascata clássica. PTX3 e CRP também regulam a via da lectina através da interação com MBL e ficolinas. As pentraxinas também reconhecem os reguladores da ativação do complemento, como o Fator H (FH), o mais importante regulador da via alternativa e o C4bp, regulador da C4b2a. (Modificado de Daigo *et al.*, 2016)

As pentraxinas curtas reconhecem diversos ligantes, na maior parte das vezes, de maneira cálcio-dependente, ativando e regulando as três vias do complemento através da interação com C1q (Roumenina *et al.*, 2006), ficolinas (Ng *et al.*, 2007; Tanio *et al.*, 2009) e o fator H (Mihlan *et al.*, 2009; Okemefuna *et al.*, 2010). Essa ativação mediada pelas pentraxinas curtas também favorece a remoção de resíduos apoptóticos com potenciais implicações na prevenção de doenças autoimunes, como artrite reumatoide, vasculite e encefalomielite alérgica (Inforzato, Reading, *et al.*, 2012; Vilahur e Badimon, 2015). As pentraxinas curtas também se caracterizam por possuírem aproximadamente 220 aminoácidos (aa), com massa molecular de 115 kDa (CRP) e 127 kDa (SAP) arranjadas numa simetria radial planar com cinco ou dez subunidades, onde cada uma das subunidades apresenta um arranjo do tipo lectina composta por uma topologia do tipo barril (*jellyroll*) de duas camadas, estabilizadas por ligações dissulfeto entre as cadeias nos aminoácidos cisteína 36 e cisteína 97 de CRP (Deban *et al.*, 2009; Du Clos, 2013; Bottazzi *et al.*, 2016). A proteína CRP humana não apresenta sítios glicosilados, enquanto a SAP humana possui uma glicosilação ligada ao N ocupado por glicanos sialilados (Mantovani *et al.*, 2013).

A produção das pentraxinas curtas se dá no fígado, por hepatócitos, em resposta a citocinas inflamatórias como a interleucina 6 (IL6) e 17 (IL17), mas não em resposta a IL1B e TNFA (Pepys e Hirschfield, 2003; Garlanda *et al.*, 2006; Inforzato, Bottazzi, *et al.*, 2012). A proteína CRP também pode ser produzida, em concentrações muito baixas por células não hepáticas, como neurônios, monócitos, células Kupffer e linfócitos e por células epiteliais do trato respiratório e do epitélio renal em certas circunstâncias, como infecções por organismos contendo fosforilcolina (ChoP, ex. *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*) (Gould e Weiser, 2001; Jabs *et al.*, 2003). Em humanos, os níveis séricos de CRP aumentam mais de 1000x num período de 48 horas em muitas condições patofisiológicas, enquanto que, em pacientes saudáveis, os níveis se mantêm praticamente indetectáveis (< 3 mg/L). Essa característica confere a CRP uma importante função como biomarcador de inflamação e dano tecidual em humanos, como infecção e doenças cardiovasculares (Daigo *et al.*, 2016), sendo inclusive amplamente utilizada na clínica médica desde a década de 1930. Por outro lado,

enquanto os níveis da proteína SAP se mantêm estáveis no soro humano, seu nível é drasticamente modulado no soro de murídeos em resposta a condições fisiopatológicas (Casas *et al.*, 2008; Deban *et al.*, 2009).

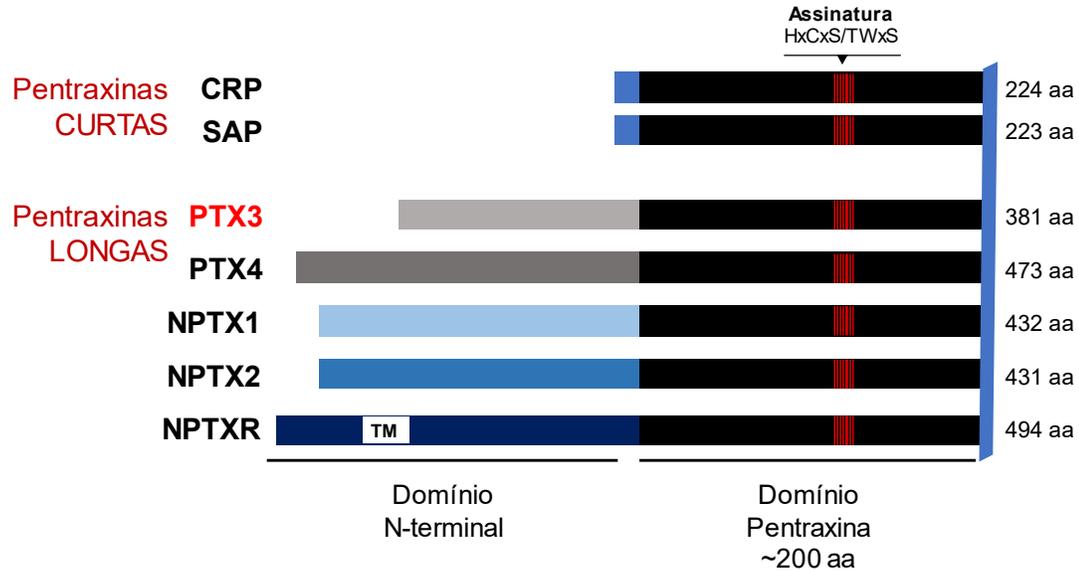


Figura 2. Proteínas que compõem a família das Pentraxinas

As pentraxinas curtas CRP e SAP foram as primeiras a serem descritas e apresentam 224 e 223 aminoácidos (aa), respectivamente. Todas as pentraxinas compartilham um domínio carboxi-terminal comum (domínio pentraxina) no qual se encontra uma sequência de 8 aa conservados (HxCxS/TWxS; x é qualquer aa) denominada “assinatura das pentraxinas”. Nas pentraxinas longas PTX3, PTX4 e as neurais NPTX1, NPTX2 e NPTXR estão presentes porções N-terminais inéditas não relacionadas entre si. A PTX3 é o protótipo das pentraxinas longas e o membro melhor caracterizado desta subfamília. TM: domínio transmembrana. (Modificado de Garlanda *et al.*, 2005).

Apesar das similaridades funcionais e estruturais, as pentraxinas longas diferem das pentraxinas curtas em vários aspectos: quanto à localização cromossômica, perfil de expressão gênica, células produtoras e ligantes (Goodman *et al.*, 1996). As pentraxinas longas possuem uma região amino-terminal (N-terminal) inédita ligada ao domínio pentraxina C-terminal, o que confere um tamanho maior (242 aa em média maior comparado às pentraxinas curtas) e novas possibilidades de ligantes a estas moléculas.

O protótipo das Pentraxinas longas é a Pentraxina 3 (PTX3) que foi identificada no início da década de 1990, como uma molécula cuja síntese era estimulada pelo fator de necrose tumoral (TNFA) em fibroblastos de prepúcio humano (o que a fez ser inicialmente conhecida como TSG14 – gene 14 estimulado por TNF) e por IL1B em células endoteliais de cordão umbilical humano (Lee *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1993) (Breviario *et al.*, 1992). Sua estrutura proteica primária é constituída pelo domínio carboxi-terminal característico das pentraxinas curtas acrescido de um domínio N-terminal inédito de 160 aa ausente em CRP e SAP. Posteriormente, outras moléculas com características semelhantes a PTX3 foram identificadas e passaram a fazer parte do grupo das pentraxinas longas: PTX4, pentraxina neural 1 (NP1 ou NPTX1), NP2 (NPTX2 ou Narp), o receptor de pentraxina neural (NPTXR ou NPR, único membro associado à célula através de um domínio transmembranar) e a apexina, encontrada em espermatozoides de *Cavia porcellus* (porquinho da índia) (Gewurz *et al.*, 1995; Garlanda *et al.*, 2005; Martinez De La Torre *et al.*, 2010). A Tabela 1 sumariza as principais características das pentraxinas curtas e longas já descritas.

O domínio pentraxina também foi encontrado em várias outras proteínas multidominais, como receptores acoplados a proteína de adesão G (especificamente as GPR144, GPR112 e GPR126) (Bjarnadóttir *et al.*, 2004) e na proteína mosaico de matriz extracelular polydom (ou SVEP1, que compreende um domínio N-terminal de do fator de von Willebrand tipo A, 2 domínios de repetição de hialina, 10 repetições de fatores de crescimento epidérmico EGF, 34 domínios de proteína de controle de complemento e um domínio de pentraxina único) (Gilgès *et al.*, 2000). Porém o papel do domínio pentraxina nessas proteínas ainda não foi elucidado (Martinez De La Torre *et al.*, 2010).

Tabela 1. Características dos membros da família das Pentraxinas

Pentraxina	Principais sítios de produção	Principal estímulo para a síntese	Funções biológicas descritas	
CURTAS	CRP	Hepatócitos (fígado)	IL6, IL17; agonistas de TLRs, glicocorticoides	
	SAP			
LONGAS	PTX3	Células dendríticas mielóides, monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, neutrófilos, adipócitos, células da glia	TNFA, IL1B, agonistas de TLRs, LPS, OmpA, lipoarabinomanana, β-glucanas	Resposta inflamatória, modulação da resposta imune inata; remodelação tecidual, angiogênese, fertilidade feminina, sistema cardiovascular
	PTX4	Pentraxina estruturalmente relacionada a PTX3 sem funções biológicas elucidadas		
	NPTX1	Desenvolvimento e diferenciação neuronal		
	NPTX2	Sistema nervoso central	Taipoxina (potente neurotoxina da serpente <i>Oxyuranus scutellatus</i>)	Sinaptogênese e plasticidade sináptica
NPTXR	Doença de Parkinson			
			Reconhecimento do material sináptico durante a remodelação da sinapse	

TLR: receptores do tipo Toll; LPS: lipopolissacarídeos; OmpA: *outer membrane protein A*.

1.2. Pentraxina 3: gene, estrutura proteica e funções biológicas

A proteína PTX3 humana é codificada por um gene situado no cromossomo 3 na banda q25.32 (em *Mus musculus* cromossomo 3 região 30.25 cM), cujo promotor é responsivo a TNFA e IL1B, mas não a IL6 (Breviario *et al.*, 1992; Presta *et al.*, 2007). Na Figura 3A, estão destacados os elementos de ligação aos fatores de transcrição que regulam finamente a expressão do gene PTX3 nas células

humanas e murinas, como AP1 (proteína ativadora 1), AP2, SP1 (proteína de especificidade), NFkB (fator nuclear *kappa* B) e GAS (sítio de ativação de interferon gama) (Balhara *et al.*, 2013). Entre estes elementos, o NFkB é essencial para a resposta transcricional aos estímulos de TNFA e IL1B, enquanto a AP1 controla a transcrição basal de PTX3 (Garlanda *et al.*, 2005; Inforzato, Reading, *et al.*, 2012). O gene de PTX3 é também controlado epigeneticamente por metilações (me) e acetilações (ac) na histona H3 (H3K23me1; H3K27me3 e H3K27Ac) de dois *enhancers*, sendo o *enhancer* 1 localizado a 260 kb *upstream* do promotor do gene de PTX3 (chr3:156,893,570-156,894,644) e o *enhancer* 2 a 350 pares de bases (bp) *downstream* do sítio de início de transcrição (TSS) de PTX3, abrangendo o segundo éxon (chr3:157,154,796-157,156,606) (Rubino *et al.*, 2017) (Figura 3B).

A proteína humana PTX3 é uma glicoproteína homo-multimérica de 381 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 17 aa. O domínio pentraxina C-terminal de PTX3 compartilha 57% de similaridade com as pentraxinas CRP e SAP. O domínio N-terminal é inédito e, portanto, não relacionado com nenhuma outra proteína conhecida (Daigo e Hamakubo, 2012). A sequência primária de PTX3 é altamente conservada filogeneticamente desde aracnídeos até mamíferos, sendo que a proteína humana e murina compartilham 92% de aminoácidos conservados o que sugere forte pressão evolutiva para manutenção de suas funções biológicas (Mantovani *et al.*, 2003).

O atual modelo quaternário proposto para proteína PTX3 é de um octâmero assimétrico de 40 kDa arranjado por duas subunidades tetraméricas independentes, uma covalente e outra não-covalente (dímero de dímeros) unidas por ligações de pontes dissulfeto nos resíduos de cisteína (Inforzato *et al.*, 2006) (Figura 4B). Predições da estrutura secundária da porção N-terminal de PTX3 indicam que a proteína tende a formar quatro α -hélices, três das quais estão provavelmente envolvidas na formação de estruturas *coiled-coils* (bobinas enroladas) (Presta *et al.*, 2007) enquanto o domínio pentraxina localizado na porção C-terminal da molécula adota uma topologia em forma de barril com folhas β antiparalelas (*jelly roll* β) (Inforzato *et al.*, 2006) (Figura 4B). Desta forma, foi proposto por Inforzato e colaboradores que a estrutura de PTX3 é um octâmero assimétrico como ilustrado na Figura 4C.

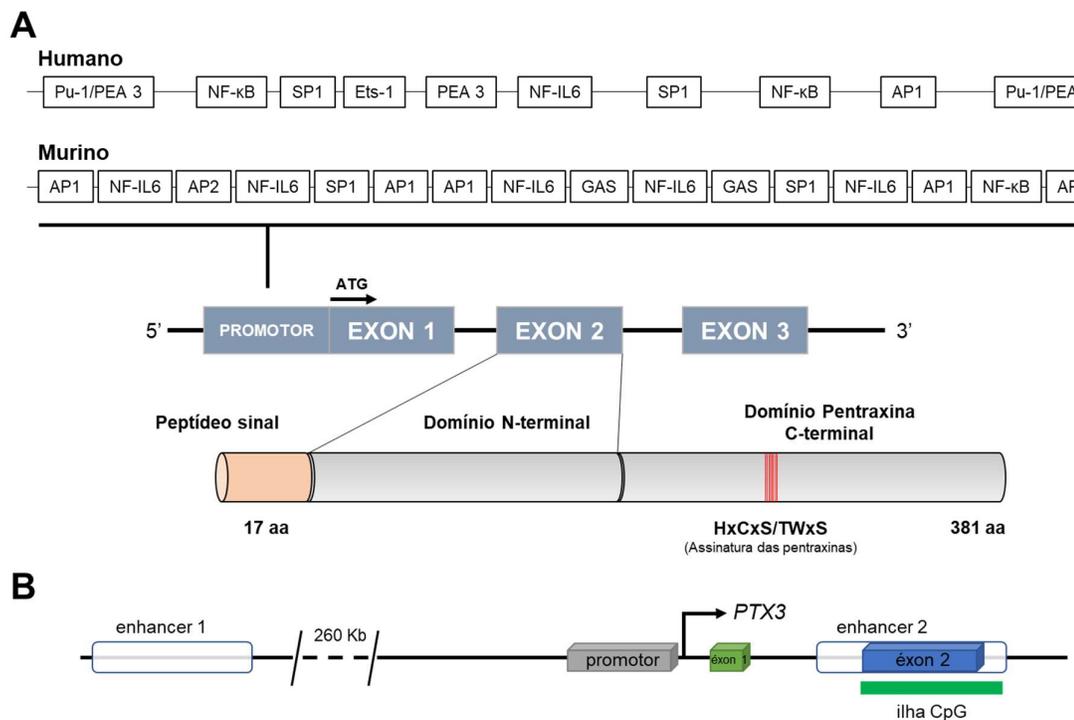


Figura 3. Estrutura do gene PTX3 em humanos e camundongos

O gene PTX3 está localizado no cromossomo 3 tanto em humanos quanto murinos (banda q22-28 em *Homo sapiens* e região 30.25 cM em *Mus musculus*) e é composto por uma região promotora e três éxons. **A)** o primeiro éxon codifica o peptídeo sinal (17 aa), enquanto o segundo e o terceiro éxons codificam os domínios N- e C- terminal da proteína (381 aa), respectivamente. A região promotora contém diversos sítios de ligação para fatores de transcrição como indicado. **B)** a expressão de PTX3 sofre regulação epigenética em dois *enhancers* que silenciam (metilações) ou amplificam (acetilações) a expressão gênica (Modificado de Balhara *et al.*, 2013; Rubino *et al.*, 2017).

A multimerização proteica de PTX3 amplia a possibilidade de ligantes em comparação com as pentraxinas curtas (Tabela 2). Outra característica estrutural importante de PTX3 é a presença de um sítio único de glicosilação (glicano ligado ao nitrogênio da amida – N-glicosilação) presente no aminoácido Asn220 (asparagina) no domínio C-terminal (Figura 4A). Esse sítio de glicosilação aumenta o peso molecular da proteína PTX3 para 45 kDa (Garlanda *et al.*, 2005) e é equivalente a 10% do peso proteico total. A fração glicosídica é completamente ocupada por oligossacarídeos complexos, principalmente açúcares biantenários fucosilados e sialilados com fração aminora de glicanos tri e tetraantenares. Foi descrito que esse sítio de glicosilação facilita a interação de PTX3 a diferentes tipos de ligantes,

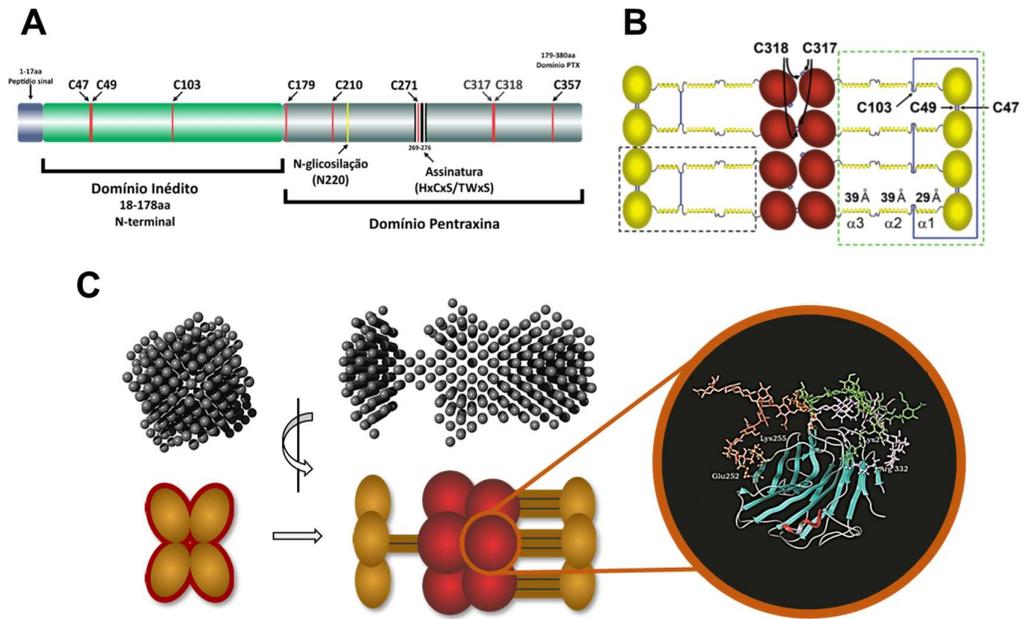


Figura 4. Estrutura proteica proposta para PTX3

A estrutura quaternária proposta para PTX3 indica uma organização octamérica assimétrica, diferentemente do que é observado nas pentraxinas curtas CPR e SAP que possuem uma estrutura cíclica pentamérica. **(A)** o monômero de PTX3 é organizado em três domínios: o peptídeo sinal (aa 1-17), o domínio exclusivo (aa 18-178) e o domínio pentraxina (aa 179-380). Em destaque os resíduos de cisteína que participam na oligomerização proteica de PTX3, os resíduos 269-276 que constituem a assinatura da família das pentraxinas e o sítio de glicosilação ligado ao N (Asn220). **(B)** Organização das ligações tipo ponte dissulfeto no octâmero de PTX3 onde a C103 une os protômeros em tetrâmeros (direita) ou em dímeros (esquerda), formando uma mistura de tetrâmeros (quadro verde) e dímeros (quadro preto), na qual estes últimos se associam em tetrâmeros de forma não covalente. O domínio N-terminal é composto de um segmento que é provavelmente globular seguido de três α hélices, cujos tamanhos em comprimento são estimados em 29, 39 e 39 Å. **(C)** pelo modelo biofísico SAXS (espalhamento de raios-X a baixo ângulo) é possível observar que a proteína se enovela de maneira assimétrica em dois octâmeros com dois domínios de tamanhos diferentes ligados por uma pequena haste. Na imagem ampliada do domínio C-terminal de PTX3 (modelo 3D baseado na cristalografia de CRP) é possível observar os oligossacarídeos de PTX3 adotando diferentes conformações (laranja, verde e roxo) e os aminoácidos de contato na superfície da proteína (bola e palito) (Modificado de Inforzato *et al.*, 2010; Daigo *et al.*, 2016).

permitindo a interação ampliada de PTX3 a outras moléculas, como o vírus Influenza, selectina P e os componentes do sistema complemento (Garlanda *et al.*, 2005; Inforzato *et al.*, 2006). A N-glicosilação é também relacionada como sendo essencial para a regulação fina do processo inflamatório por PTX3, por exemplo, na atenuação do recrutamento de neutrófilos (Deban *et al.*, 2010).

Tabela 2. Especificidade de ligantes de CRP, SAP e PTX3

Ligante	CRP	SAP	PTX3
Microrganismos			
Bactérias			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NT	NT	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NT	NT	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	+	+
Fungos e leveduras			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	NT	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (zymosan)	+	+	+
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	NT	NT	+
Vírus			
Influenza virus	-	+	+
Human cytomegalovirus (HCMV)	NT	NT	+
Chikungunya virus	NT	NT	+
Ross River virus	NT	NT	+
Motivos de membrana			
Fosfocolina (PC)	+	-	-
Fosfoetanolamina (FE)	-	+	-
Lipopolisacarídeo (LPS)	-	+	-
Proteína A da membrana externa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KpOmpA)	NT	NT	+
Componentes do complemento			
C1q	+	+	+
Fator H	+	NT	+
C4BP	+	+	+
M-, L-ficolina	+	-	+
MBL	-	+	+
Proteínas da matriz extracelular			
Gene 6 estimulado por TNF (TSG-6)	NT	NT	+
Inibidor inter- α -tripsina (I α I)	-	NT	+
Ácido hialurônico	NT	NT	-
Laminina	+	+	-
Colágeno IV	NT	+	-
Fibronectina	+	+	-
Fatores de crescimento			
FGF2	+/-	NT	+
FGF8	NT	NT	+
FGF1 e FGF4	NT	NT	-
Moléculas de adesão			
Selectina-P	-	NT	+

NT: não testado. (Adaptado de Inforzato, Reading, *et al.*, 2012)

Em resposta a estímulos pró-inflamatórios, como agonistas de receptores do tipo Toll (TLR), lipopolissacarídeos (LPS), OmpA (proteína A de membrana externa de bactérias Gram-negativas), IL1B e TNFA, a proteína PTX3 é secretada principalmente por células dendríticas, mas também por monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, células do músculo liso, rim, células epiteliais, células sinoviais, condrócitos, adipócitos, células do epitélio alveolar, células da granulosa e células da glia (revisado por Garlanda et al., 2005; Bottazzi et al., 2010) (Tabela 1). Tanto cardiomiócitos humanos (Peri et al., 2000) quanto as células endoteliais linfáticas humanas e murinas (Wick et al., 2007; revisado por Moalli, Jaillon, et al., 2011) expressam PTX3 constitutivamente. Recentemente, dados do nosso grupo também mostraram que PTX3 é expressa tanto constitutivamente, quanto em resposta à infecção por Toxina A de *Clostridium difficile* por células do epitélio intestinal tanto de humanos quanto de camundongos (De Araújo Junqueira et al., 2011; Oliveira et al., 2017). Em neutrófilos maduros, PTX3 é encontrada armazenada em grânulos específicos não azurofílicos, lactoferrina e lactoferrina/gelatinase positivos (NETs – armadilhas extracelulares de neutrófilos) que servem de reservatório para sua liberação rápida em resposta a estímulos pró-inflamatórios (Jaillon et al., 2007; Inforzato, Bottazzi, et al., 2012). Adicionalmente, a expressão da proteína PTX3 é inibida por Interferon Gama (IFNG) e glicocorticoides em células hematopoiéticas, como células dendríticas, monócitos e macrófagos, enquanto a Interleucina 10 (IL10) amplifica a expressão de PTX3 em resposta a LPS (Doni et al., 2006; Doni et al., 2008).

1.2.1. Funções na resposta imune inata e inflamação

Na inflamação, PTX3 tem papel regulatório pela modulação da ativação do complemento (incluindo as três vias: clássica, alternativa e lectina), opsonização de patógenos (Deban et al., 2010) e regulação da inflamação. A modulação da atividade do complemento se dá pela interação de PTX3 a moléculas como C1q, ficolina-1, ficolina-2 e MBL (*mannose binding lectin*). O primeiro ligante para PTX3 identificado e melhor caracterizado é o componente do complemento C1q (Bottazzi et al., 1997). A interação de PTX3 com C1q imobilizado resulta na ativação da cascata da via clássica medida, em condições experimentais, pela deposição de C3 e C4. Por outro lado, PTX3 solúvel causa uma inibição de maneira dose-dependente

da atividade hemolítica de C1q através de um bloqueio competitivo de sítios de interações relevantes (Nauta *et al.*, 2003). Portanto, PTX3 pode exercer dupla função e efeitos contrastantes na ativação do complemento: facilita a depuração de materiais que se ligam a PTX3 (como microrganismos) e protege contra ativação do complemento não desejada na fase fluida (Inforzato, Bottazzi, *et al.*, 2012). PTX3 também interage com os membros da via lectina (ficolina-1, ficolina-2 e MBL), amplificando a deposição de complemento dependente de ficolina-2 e MBL na superfície de *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, respectivamente (Ma *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2011).

Além dos papéis desempenhados na ativação do complemento, os níveis plasmáticos de PTX3 aumentam rapidamente em diferentes contextos fisiopatológicos, agindo como uma molécula de reconhecimento de padrões com papel não-redundante na resposta imune inata (Mantovani *et al.*, 2003) (Inforzato, Reading, *et al.*, 2012). Desde sua identificação, PTX3 é descrita como uma proteína que promove resistência inata a determinados tipos de infecção através da interação a motivos diferentes de microrganismos patogênicos, como os fungos *Aspergillus fumigatus* (Gaziano *et al.*, 2004), *Paracoccidoides brasiliensis* (Diniz *et al.*, 2004) e as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (Moalli, Paroni, *et al.*, 2011), *Klebsiella pneumoniae* (Soares *et al.*, 2006). Nestes casos, PTX3 age como uma opsonina apresentando esses antígenos para células fagocíticas, como os macrófagos via receptor FCγ e sistema complemento, aumentando a atividade fagocítica e microbicida dos macrófagos (Garlanda *et al.*, 2016).

Jaillon e colaboradores mostraram efeito protetor de PTX3 em infecções do trato urinário, onde camundongos deficientes para PTX3 apresentaram inflamação exacerbada e resposta imunológica debilitada a infecções contra *Escherichia coli* uropatogênica, dificultando a depuração microbiana dependente de neutrófilos (Jaillon *et al.*, 2014). Já em camundongos CD-1 recém-nascidos, a administração oral de PTX3 promoveu resistência inata contra infecção causada por de *Pseudomonas aeruginosa* no pulmão (Jaillon *et al.*, 2013; Jaillon *et al.*, 2014).

Em infecções virais, PTX3 apresentou efeitos antagonistas. O domínio N-terminal de PTX3 é o principal sítio de interação com alfavírus artritogênicos

(Chikungunya virus e Ross River virus), e a ligação de PTX3 a estes virus é reportada como facilitadora da invasão e replicação viral durante a fase aguda da infecção, porém, na infecção crônica, a ligação com PTX3 causa inativação viral (Foo, Chen, *et al.*, 2015; Foo, Reading, *et al.*, 2015). Por outro lado, a PTX3 facilita a neutralização viral de Influenza virus (H3N2) através da interação da hemaglutinina viral com o ácido siálico presente na porção glicosídica de PTX3, neutralizando a hemaglutinação induzida pelo vírus e a atividade da neuraminidase viral (Bottazzi *et al.*, 2010), enquanto que o vírus Influenza A H1N1 é resistente a atividade antiviral de PTX3 (Job *et al.*, 2010).

Também foi descrito que a expressão aumentada de PTX3 confere a camundongos transgênicos maior resistência à toxicidade do LPS e à infecção causada pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco (Dias *et al.*, 2001).

A deficiência de PTX3 está associada ao maior dano tecidual decorrente da isquemia e reperfusão cardíaca (Salio *et al.*, 2008) e em modelo de pleurisia experimental, a maiores danos nos rins e pulmões dos camundongos nocaute para *Ptx3* do que nos do tipo selvagem (Deban *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2012). Por outro lado, *Ptx3* mostrou-se deletéria em modelos de isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior, aumentando mortalidade e danos teciduais (Souza *et al.*, 2009) além de acelerar lesão pulmonar em modelo experimental murino de ventilação mecânica (Real *et al.*, 2012). Em modelos de infecção pulmonar com bactérias *Klebsiella pneumoniae*, PTX3 mostrou função dual dependente da quantidade do inóculo. Quando ocorre um baixo inóculo, a expressão aumentada de PTX3 apresenta funções protetoras, enquanto, após um alto inóculo um efeito deletério é observado (Soares *et al.*, 2006). Estes dados indicam que PTX3 tem impacto crítico como regulador fino da inflamação, com efeitos danosos e benéficos, dependendo da natureza e intensidade da lesão (Soares *et al.*, 2006; Inforzato, Reading, *et al.*, 2012).

1.2.2. Funções na remodelação tecidual e fertilidade feminina

Além das funções na inflamação e imunidade, a proteína PTX3 também desempenha papéis importantes no remodelamento e reparação tecidual e na

fertilidade feminina (Salustri *et al.*, 2004). Foi mostrado que as células do cúmulo oophorus do folículo ovariano de camundongos expressam PTX3 que, através do domínio N-terminal, interage com a proteínas TSG-6 e Ial (inibidor inter- α -tripsina) durante a expansão do cúmulo. Essa interação proteína-proteína fornece integridade estrutural para a matriz do cúmulo (Salustri *et al.*, 2004; Scarchilli *et al.*, 2007). Em modelo murino deficiente para Ptx3, foi observada uma deficiência grave na fertilidade da fêmea devido à falha na montagem da matriz rica em hialuronano viscoelástico (HA), que é formada em torno do oócito no folículo pré-ovulatório, assim possibilitando a formação do cúmulos que forma a corona radiata e é essencial para manutenção da integridade do oócito (Salustri *et al.*, 2004). Alterações nos níveis plasmáticos de PTX3 também estão relacionadas com algumas doenças ovarianas. Na síndrome do ovário policístico, por exemplo, os níveis de PTX3 circulante estão diminuídos (Tosi *et al.*, 2014), enquanto em modelos de rato com torção ovariana o efeito inverso foi observado (Akman *et al.*, 2015).

Com relação à regeneração tecidual, a proteína PTX3 possui funções não redundantes em diferentes modelos de dano tecidual, como regeneração de feridas na pele, lesão hepática, lesão pulmonar e trombose arterial (Bottazzi *et al.*, 2016). Foi mostrado que PTX3 é produzida na matriz pericelular de macrófagos e de células mesenquimais em resposta a ativação dos TLRs e que, deficiência para PTX3 acarreta numa fibrinólise pericelular deficiente *in vitro* e numa migração coletiva direcional na matriz provisória rica em fibrina *in vivo* (Doni *et al.*, 2015). A deficiência de PTX3 está associada ao aumento da formação de coágulo e deposição de fibrina, por um mecanismo de interação com a fibrina e plasminogênio através do domínio N-terminal, onde PTX3 facilita a fibrinólise dependente de plasminogênio (Doni *et al.*, 2015; Bottazzi *et al.*, 2016).

1.2.3. PTX3 como biomarcador de patologias

Estudos recentes vêm apontando o potencial de PTX3 como biomarcador de algumas doenças. Níveis circulatórios de PTX3 estão significativamente aumentados em diversas condições fisiopatológicas, como mortalidade por sepse (Hill *et al.*, 2009), tuberculose (Azzurri *et al.*, 2005), bacteremia (Huttunen *et al.*, 2011), em doenças do sistema cardiovascular (Kume *et al.*, 2011; Ustundag *et al.*, 2011), do

sistema reprodutivo feminino (Aydogdu *et al.*, 2012) e do rim (Argani *et al.*, 2012; Sjöberg *et al.*, 2016).

No contexto da biologia vascular, já foi mostrado que alterações na concentração de PTX3 no plasma sanguíneo estão relacionadas a com severidade de diferentes doenças cardiovasculares. Por exemplo, em angina instável, níveis de PTX3 estavam aumentados em relação aos níveis de pacientes saudáveis (Inoue *et al.*, 2007). O mesmo fenômeno é observado em pacientes com insuficiência cardíaca comum e congestiva (Kotooka *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2008), em acidente vascular cerebral (AVC) (Ryu *et al.*, 2012), em arterite temporal (GCA) (Baldini *et al.*, 2012), vasculite (Fazzini *et al.*, 2001) e na síndrome coronariana aguda (Ustundag *et al.*, 2011). No caso do infarto do miocárdio, PTX3 é um biomarcador mais rápido comparado a CRP, pois os níveis plasmáticos de PTX3 tem pico 7 horas e meia após o infarto, enquanto que o pico de expressão de CRP é por volta de 50 horas (Peri *et al.*, 2000). A proteína PTX3 é expressa em cardiomiócitos e células musculares lisas vasculares e deficiência na expressão de PTX3 está associada com o aumento da inflamação e dano cardíaco (Salio *et al.*, 2008) e aterosclerose (Norata *et al.*, 2009), enquanto que expressão positiva de PTX3 está relacionada com a inibição da estenose das carótidas por pacientes submetidos ao procedimento da angioplastia (Camozzi *et al.*, 2005). Por esses motivos, o papel de PTX3 humana em desordens cardiovasculares se mantém controversa. A literatura sugere que o aumento dos níveis plasmáticos de PTX3 em condições cardiopatológicas pode ter a ver com o fato de PTX3 funcionar apenas como um *bystander* da resposta inflamatória, ou mesmo como uma tentativa do corpo de combater a patologia (Falasca *et al.*, 2013).

O aumento nos níveis de expressão de PTX3 também foi associado com a severidade da pré-eclâmpsia (PE) e da restrição de crescimento intrauterino (IUGR) (Cetin *et al.*, 2006; Cozzi *et al.*, 2012). Enquanto que a PE é um distúrbio da gravidez caracterizada por um processo inflamatório materno excessivo que leva a falhas na remodelação dos vasos uterinos por disfunção endotelial no primeiro trimestre da gravidez, causando insuficiência placentária, a IUGR é forma fetal da doença, levando a um desenvolvimento inadequado do feto, por oxigenação ou nutrição materna insuficiente (Cozzi *et al.*, 2012). Foi mostrado que os níveis de PTX3 estão

significativamente aumentados em casos severos de PE e casos de IUGR com PE em comparação com gravidez normal (Cozzi *et al.*, 2012).

Além dessas doenças, vários novos estudos vêm mostrando o potencial uso de PTX3 como um potente biomarcador para prognóstico da severidade de cânceres. Níveis aumentados de PTX3 têm sido identificados em câncer de próstata (Stallone *et al.*, 2014), lipossarcoma (Willeke *et al.*, 2006), glioma (Locatelli *et al.*, 2013), de pulmão (Diamandis *et al.*, 2011) e de cancer de pâncreas (Kondo *et al.*, 2013). Stallone e colaboradores (2014) mostraram que as modificações nos níveis de expressão tecidual e plasmática de PTX3 são capazes de discriminar pacientes com câncer de próstata daqueles com hiperplasia prostática benigna e inflamação prostática, sendo um marcador mais sensível que o antígeno prostático específico (PSA) e CRP para esse tipo de câncer (Stallone *et al.*, 2014).

No trabalho descrito por Planque e colaboradores (2009), os autores selecionaram candidatos a marcadores de câncer de pulmão empregando ferramentas de proteoma e bioinformática em linhagens de células tumorais de pulmão (adenocarcinoma H23, carcinoma de células escamosas H520, carcinoma H460 e H1688) e identificaram a PTX3 como um forte candidato (Planque *et al.*, 2009). O mesmo grupo, em 2011, analisou as amostras de soro de pacientes com câncer de pulmão e validaram a PTX3 como um biomarcador extremamente específico e sensível para o diagnóstico deste tipo de neoplasia (Diamandis *et al.*, 2011).

Outro estudo que demonstrou o potencial de PTX3 como biomarcador em câncer foi o publicado por Willeke e colaboradores (2006). Utilizando análises de expressão gênica e de proteína de amostras de pacientes com lipossarcoma, os autores revelaram que os níveis aumentados de PTX3 estavam associados a diferenciação de adipócitos e a todos os subtipos de lipossarcoma (mixóide, lipoma atípico, pleomórfico e não diferenciado) (Willeke *et al.*, 2006). Um estudo similar também mostrou que os níveis de PTX3 estavam aumentados em linhagens de células de câncer pancreático (PANC-1 e MIA PaCa-2) e que o aumento da expressão de PTX3 está associado a um prognóstico ruim de pacientes com carcinoma pancreático (Kondo *et al.*, 2013).

Além do papel como biomarcador, outros estudos vêm mostrando PTX3 como um agente modulador da tumorigênese de diferentes tipos de câncer (Alessi *et al.*, 2009; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Um dos mecanismos pelo qual PTX3 exerce essas funções é através da interação proteína-proteína com vários membros da família dos fatores de crescimento de fibroblastos, como FGF2, FGF8 e FGF17, onde PTX3 modula a proliferação, migração, sobrevivência e angiogênese tumoral promovida por esses fatores (Rusnati *et al.*, 2004; Leali *et al.*, 2011; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013).

1.3. Interação entre PTX3 e membros da família FGF

Os Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF) constituem uma das maiores famílias de fatores de crescimento e, em mamíferos, possuem 18 membros relacionados estruturalmente. Estes fatores possuem uma região central homóloga de 120 a 130 aminoácidos arranjados em folhas- β antiparalelas, flanqueadas por domínios amino (N-) e carboxi (C-) terminais divergentes. Essa conformação, com base na filogenia e na homologia da sequência proteica, permite que os membros da família FGF possam ser agrupados em seis subfamílias: 1) FGF1 e FGF2; 2) FGF3, FGF7, FGF10 e FGF22; 3) FGF4, FGF5 e FGF6; 4) FGF8, FGF17 e FGF18; 5) FGF9, FGF16 e FGF20; 6) FGF19, FGF21 e FGF23 (Beenken e Mohammadi, 2009). Em geral, variações na sequência primária das pontas dos domínios N- e C- estão relacionadas com funções biológicas diferentes (Olsen *et al.*, 2003). Fatores homólogos que possuem alta identidade de resíduos (36 a 40% na região folha- β central) com os membros da família FGF e que antigamente eram considerados como membros desta família (FGF11, FGF12, FGF13 e FGF14) atualmente são classificados como fatores homólogos a FGF e chamados de FHF 1, FHF2, FHF3 e FHF4. Os FHF não ativam os receptores de FGF (FGFR) e, por isso, não são considerados membros desta família (Olsen *et al.*, 2003).

Os FGFs são proteínas que podem ser tanto secretadas (FGF secretadas) ou proteínas intracelulares não sinalizadoras (iFGFs), que servem como cofatores para canais de sódio e outras moléculas, como β -tubulina e IKBKG (modulador essencial do fator nuclear-*kappa*-B) (Ornitz e Itoh, 2015). Os FGF secretados são expressos em praticamente todos os tecidos e atuam de forma parácrina/autócrina,

regulando uma grande diversidade de processos biológicos durante a embriogênese, como organização e padronização tecidual, morfogênese e desenvolvimento dos membros (Beenken e Mohammadi, 2009). Em adultos, os FGF secretados funcionam como fatores homeostáticos, importantes para a manutenção, reparo e regeneração tecidual e metabolismo (Ornitz e Itoh, 2015) (Harmer *et al.*, 2004). Nas células, estes fatores regulam, tanto positivamente quanto negativamente, vários processos fundamentais tais como sobrevivência, migração, diferenciação e metabolismo celular (Beenken e Mohammadi, 2009; Ornitz e Itoh, 2015)

Dentre os membros da família, o tipo 2 (FGF2) é o protótipo e o fator melhor caracterizado. O FGF2 é um FGF secretado que não possui peptídeo sinal, sendo exportado para fora da célula através de um mecanismo de translocação direta pela membrana celular por um complexo chaperona que inclui sinaptotagmina-1 e a proteína de ligação ao cálcio S100A13 (Landriscina *et al.*, 2001; Prudovsky *et al.*, 2003; Ornitz e Itoh, 2015). Também já foi descrito que FGF2 transita por dentro da célula, sendo inclusive encontrado no núcleo celular, por um mecanismo proposto de interação com a chaperona citosólica HSP90 (*heat shock protein 90*) (Wesche *et al.*, 2006).

Após sua secreção pelas células, o FGF2 fica imobilizado na matriz extracelular, ligado firmemente a proteoglicanos de sulfato de heparana (HSPGs). Os HSPGs limitam a difusão do FGF2 pela matriz extracelular (ECM) e servem como cofatores que regulam a especificidade e afinidade para a sinalização ao receptor de FGF (FGFR) (Ornitz, 2000). A ação das heparanases, proteases ou proteínas de ligação específicas a FGF (FGFBP), liberam o FGF2 da matriz extracelular e a interação deste fator aos HSPGs estabiliza o engajamento do FGF2 ao seus receptores específicos do tipo tirosina quinase (RTK) (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4) formando uma estrutura ternária (complexo FGF2/HSPG/FGFR) que medeia a ativação de múltiplas vias de transdução de sinal (Burke *et al.*, 1998; Ori *et al.*, 2008). Os FGFRs consistem de três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina (Ig), uma hélice transmembrana simples e um domínio intracelular do tipo tirosina quinase (TK). O segundo e o terceiro domínios Ig formam um grampo de ligação ao FGF e tem domínios distintos que se ligam tanto aos FGFs quanto aos

HSPGs. O sítio preferencial de ligação ao FGF está no domínio 2 (Ig II) e o domínio Ig III está relacionado à especificidade. Formas alternativas geradas por processamento alternativo (*splicing* alternativo) na Ig III reforçam a especificidade de ligação, onde as variantes IIIb e IIIc são expressas predominantemente em tecidos epiteliais e mesenquimais, respectivamente (Ornitz *et al.*, 1996; Turner e Grose, 2010). O FGFR4 é descrito como sendo o principal receptor para FGF2 (Ornitz *et al.*, 1996).

Quando o complexo FGF2/HSPG/FGFR é formado, uma série de eventos de fosforilação e desfosforilação ocorrem no domínio intracelular TK do FGFR recrutando proteínas adaptadoras, como FRS2 α (substrato 2 α de FGFR) e PLCY1 (fosfolipase C). Essas proteínas adaptadoras, então, ativam proteínas de diferentes vias de sinalização relacionadas à sobrevivência, migração, proliferação, diferenciação de células e no processo angiogênico, como a via RAS-MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), que tem efeito principalmente na proliferação celular promovendo entrada na fase S do ciclo celular e PI3K-AKT1 (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) que está relacionada com a sobrevivência celular e apoptose (Turner e Grose, 2010; revisado por Goetz e Mohammadi, 2013) (Figura 5).

A relação da via FGF com a progressão de várias doenças humanas é bem documentada na literatura. Várias condições fisiopatológicas estão associadas à desregulação da sinalização mediada por FGF, seja por ganho ou perda de função dos ligantes ou devido a mutações nos receptores. Por exemplo, a perda de função de FGF3 está associada à surdez (Tekin *et al.*, 2008); a síndrome de Kallman, que é uma desordem genética associada à incapacidade de uma pessoa iniciar ou completar a puberdade, está relacionada com a perda de função de FGF8 (Hardelin e Dode, 2008); o raquitismo hipofosfatêmico (paciente que possui deficiência na absorção intestinal de cálcio e fosfato, além de não responder à vitamina D) está ligado a ganho de função de FGF23 (Consortium, 2000); a síndrome de Pfeiffer, doença genética rara que causa fusão prematura dos ossos do cérebro, mãos e pés, é causada por mutações em FGFR1 e FGFR2 (Giancotti *et al.*, 2017); e a acondroplasia, forma genética mais comum do nanismo está associada a mutações no FGFR3 (Ornitz e Legeai-Mallet, 2017).

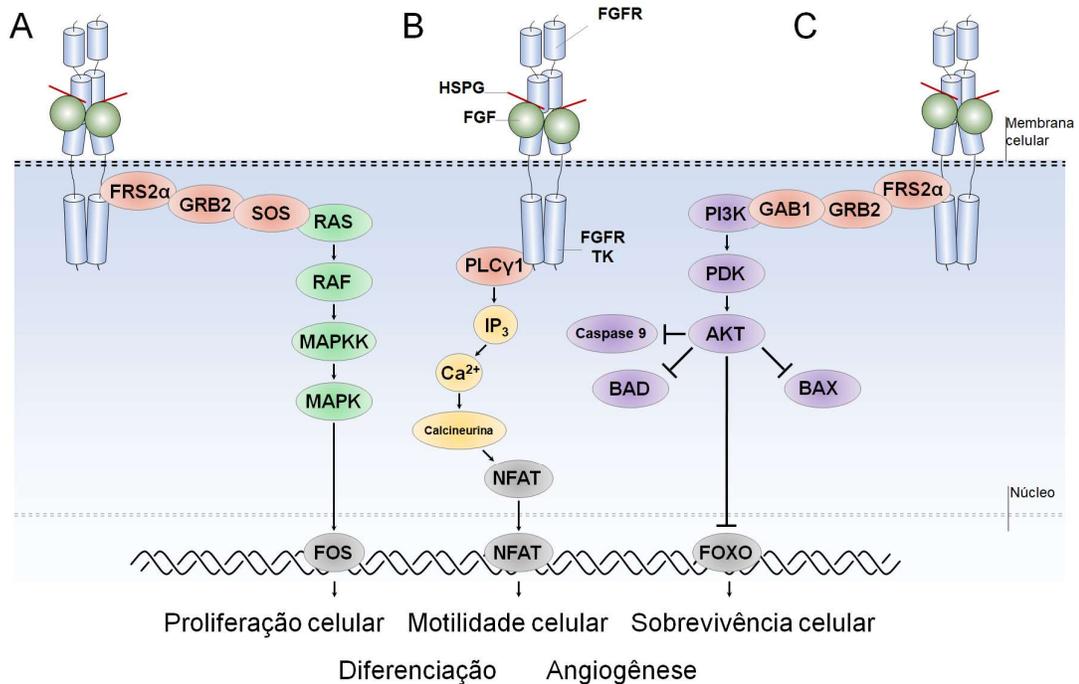


Figura 5. Sinalização mediada pelo sistema FGF/FGFR

A ligação de FGF ao FGFR induz dimerização do receptor promovendo uma transfosforilação da porção quinase do receptor. O FGFR ativado, ativa outros substratos intracelulares por fosforilação, ativando diferentes vias de sinalização e gerando diversas respostas celulares. Os principais substratos da quinase de FGFR são FRS2A (FGFR *substrate* 2 α) e a PLCY1. **(A)** FRS2A ativado se liga a proteína adaptadora GRB2 que recruta SOS que ativa RAS (GTPase), iniciando a ativação da cascata da MAPK. MAPK ativada se transloca do citoplasma para o núcleo onde fosforila fatores de transcrição, como FOS para induzir transcrição de genes específicos. O resultado dessa via é primariamente proliferação celular, mas também promove diferenciação e migração celular. **(B)** Recrutamento e fosforilação de PLCY1 dispara vias de sinalizações importantes para a migração e diferenciação celular, podendo influenciar nas vias MAPK e AKT. A via por PLCY1 induz ativação de NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) que estimula a expressão de genes associados a motilidade celular. **(C)** O substrato FRS2A também recruta GAB1 que ativa a quinase AKT. A ativação da quinase AKT inativa efetores pró-apoptóticos como BAD (*BCL-2 antagonist of cell death*) e os fatores de transcrição FOXO (*forkhead box class O*), desta forma promovendo sobrevivência celular. (modificado de Goetz e Mohammadi, 2013)

A estrutura quaternária octamérica de PTX3 possui dois sítios capazes de se ligarem a FGF2 (Inforzato *et al.*, 2010). Leali e colaboradores (2010) mostraram que a menor unidade de PTX3 capaz de se ligar a FGF2 é o pentapeptídeo acetilado ARPCA (Alanina, Arginina, Prolina, Cisteína, Alanina) localizado no domínio N-terminal aa 100-104. Esse pentapeptídeo foi capaz de interferir na ligação de FGF2 tanto à molécula de PTX3 completa quando ao complexo HSPG/FGFR1 (Leali *et al.*,

2010). Já foi mostrado que a ligação de FGF2 a PTX3 inibiu a transição epitélio-mesênquima (EMT) em modelo experimental de melanoma murino (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013) e a proliferação dependente de FGF2 em células endoteliais *in vitro* e angiogênese *in vivo* (Rusnati *et al.*, 2004). De forma similar, PTX3 também inibe a ação da isoforma b de FGF8 (FGF8b) em tumores regulados por hormônios esteroides, como carcinoma mamário murino e tumor prostático humano (Leali *et al.*, 2011; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013). Dados recentes do nosso grupo também mostraram que PTX3 inibe a proliferação celular *in vitro* e a progressão tumoral de fibrossarcomas *in vivo* em camundongos NOD/SCID (Comunicação pessoal).

Além disso, estudos tem mostrado que PTX3 também é capaz de interagir com menor afinidade com outros membros da família FGF, como FGF17, FGF6 e FGF10 (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Giacomini *et al.*, 2015), sugerindo PTX3 como inibidor multialvo de várias moléculas de FGFs. Assim, a caracterização do papel de PTX3 no contexto das neoplasias vem sendo alvo de muitas pesquisas motivado pela ação desta molécula como antagonista natural capaz de comprometer funções biológicas dos FGFs como proliferação celular e angiogênese que tem grande impacto na tumorigênese e progressão tumoral

1.4. O processo tumorigênico

O processo tumorigênico é descrito como sendo a origem, produção e desenvolvimento de tumores que está relacionado por um acúmulo de mudanças genótípicas e fenotípicas em células normais (Croce, 2008). Essas mudanças podem levar vários anos, mas uma vez fixadas, promovem o desbalanço nas taxas de proliferação e morte celular, e conseqüentemente, a perda do controle mitótico, fator crucial para a formação de uma massa maligna (Hanahan e Weinberg, 2000; Hanahan e Weinberg, 2011). O descontrole proliferativo favorece que a massa tumoral recém-formada se expanda para as áreas adjacentes, de forma a comprometer a integridade dos órgãos e tecidos.

O tumor, entretanto, não pode ser visto apenas como sendo um agregado de células cujo controle do ciclo celular se encontra deficiente, mas sim como um tecido complexo heterogêneo, formado por células normais, que são geneticamente

estáveis, e pelas células neoplásicas (Quail e Joyce, 2013). A relação harmônica entre os diferentes tipos de células que compõe o tumor é uma das principais características que define o microambiente tumoral (TME). Além disso, o TME é conhecido por evoluir constantemente em resposta a fatores ambientais e a sinais oncogênicos, dificultando ainda mais a já difícil compreensão e tratamento do câncer.

Hanahan e Weinberg (2000) elencaram os principais *hallmarks* (propriedades) que eles acreditam governar o sucesso do crescimento tumoral e da disseminação metastática: (1) escape dos sinais anti-proliferativos; (2) potencial replicativo ilimitado; (3) indução da angiogênese; (4) resistência à morte celular; (5) manutenção dos sinais pró-proliferativos e (6) invasão tecidual e metástase. Mais recentemente, os próprios autores destacaram que outras novas capacidades também são importantes para a progressão tumoral: (7) capacidade de reprogramação do metabolismo celular; (8) fuga da resposta imunológica das células *natural killer*, macrófagos e linfócitos T e B; (9) mutações e instabilidade genética e (10) inflamação promovida por tumores (Hanahan e Weinberg, 2011). A enumeração de todas essas propriedades revela a substancial complexidade do processo tumorigênico.

A imortalidade replicativa, é uma função descrita como sendo a capacidade da célula em superar o número limitado de ciclos de crescimento e divisão celular sucessivos, uma das principais características encontradas nas células neoplásicas é o ganho de função da telomerase, DNA polimerase especializada em adicionar telômeros – repetições em tandem de hexanucleotídeos – nas pontas dos cromossomos (Buolamwini, 1999). Os níveis proteicos da telomerase são praticamente ausentes em células não neoplásicas, mas foi observado que em 90% das células imortalizadas espontaneamente ou em células neoplásicas possuem altos níveis de expressão da telomerase. A produção constitutiva da telomerase pelas células tumorais é uma vantagem, pois a produção contínua dos telômeros ajuda na proteção das pontas das cromátides, diminuindo a chance de fusões ponta-a-ponta com outras cromatinas, que levam a variações no cariótipo e a morte celular (Hanahan e Weinberg, 2011).

Outros mecanismos muito importantes são o escape das células tumorais à ação de supressores de crescimento e perda da inibição do crescimento por contato célula-célula (inibição por contato). Por exemplo, as proteínas TP53 (*tumor protein p53*) e RB (*retinoblastoma-associated*), controlam os programas de apoptose e da senescência celular, são *gatekeepers*, ou seja, controlam a decisão que indica para as células se elas devem ou não entrar no ciclo de crescimento e divisão celular, e defeitos na produção destes dois genes, está amplamente relacionado com a progressão tumoral (Dick e Rubin, 2013; Kim *et al.*, 2015). Os tumores também não entram em senescência e apoptose em resposta aos sinais provenientes do contato célula-célula, por dois mecanismos principais. O primeiro tem a ver com a perda de função da proteína STK11 (serina/treonina 11-quinase), que funciona organizando a estrutura epitelial e mantendo a integridade do tecido. Entretanto, STK11 é descrita como um forte antagonista dos efeitos pró-mitogênicos de MYC (proto-oncogene MYC, homólogo do oncogene viral de mielocitomatose aviária V-myc) e quando há perda de função de STK11, a integridade celular se desestabiliza e as células se tornam susceptíveis à transformação induzida por MYC (Partanen *et al.*, 2009). O segundo mecanismo tem a ver com a perda de função das proteínas NF(neurofibromina)1 e NF2, cuja função é orquestrar a inibição do contato célula-célula por facilitar o acoplamento de moléculas de adesão de superfície, como a E-caderina, com receptores tirosina quinase transmembrana, como os receptores EGFR e FGFR, impedindo que estes receptores ativem vias de sinalização relacionadas com a proliferação, migração e transformação celular (Hanahan e Weinberg, 2011; Bruzek *et al.*, 2017).

Recentemente foi mostrado que centenas de RNA regulatórios (micro-RNA) também têm sido relacionados com diferentes fenótipos tumorais (Garzon *et al.*, 2010). Os miRNAs são uma classe de RNAs pequenos não codificantes (de aproximadamente 20 a 22 nucleotídeos) encontrados em uma variedade de organismos, como vírus, plantas e animais e cuja principal função é ditar a regulação gênica pós-transcricional através da ligação a fita de vários RNAs mensageiro (mRNA), levando a uma inibição da tradução ou a degradação da fita codificadora (Bartel, 2009). Em condições fisiológicas normais, os miRNA agem por mecanismos de *feedback* regulando processos biológicos importantes como a apoptose,

proliferação e diferenciação celular (Bruce *et al.*, 2015). Por outro lado, a literatura vem reportando que desregulação de um único miRNA modifica profundamente a expressão de centenas de mRNAs, favorecendo a transformação celular (Reddy, 2015). Jin e colaboradores em 2011 mostraram que a expressão positiva de miR-149 foi encontrada em isolados de melanoma metastático em pacientes humanos, onde miR-149 inibe a tradução do mRNA do gene supressor de tumor TP53 (Jin *et al.*, 2011).

O sucesso da expansão do microambiente tumoral (TME) também está diretamente ligado à biodisponibilidade contínua de oxigênio e nutrientes (Hanahan e Weinberg, 2011). Para isso, as células neoplásicas são especializadas em secretar um conjunto de fatores proteicos que estimulam a produção de vasos sanguíneos para dentro da massa tumoral, no processo conhecido como angiogênese (Carmeliet e Jain, 2000). A angiogênese é essencial para fenômenos fisiológicos normais do desenvolvimento, como a organogênese, e para condições fisiológicas normais no indivíduo adulto, como a reparação de injúria tecidual e a formação do endométrio e da placenta (Dewitt, 2005) e é um processo estritamente regulado por um balanço sutil entre moléculas pró- e anti-angiogênicas sendo o desequilíbrio dessas moléculas descrito como facilitador do desenvolvimento não só de tumores como também de diversas outras doenças, como a psoríase (Yamamoto, 2013), a artrite reumatoide (Wang *et al.*, 2012), a retinopatia diabética (Yoshida *et al.*, 1999), a inflamação crônica, a aterosclerose (Ozaki *et al.*, 2006; Kobayashi e Lin, 2009). No que se refere ao câncer, a angiogênese é um mecanismo chave para o sucesso do progresso tumoral (Ribatti, 2008), pois favorece sua proliferação, invasão local e metástase hematogênica (Carmeliet e Jain, 2000; Alessi *et al.*, 2009).

Entre as dezenas de fatores angiogênicos e citocinas que são altamente expressas em tumores, membros da família dos VEGFs (fator de crescimento endotelial vascular) e seus receptores (VEGFRs) tem sido investigados extensivamente devido à capacidade de promoverem o crescimento de células vasculares endoteliais derivadas de artérias, veias e de vasos linfáticos (Ziche *et al.*, 2004). Apesar dos esforços no desenvolvimento de estratégias anti-angiogênicas para tratamento clínico de cânceres com base na inibição do sistema VEGF/VEGFR, muitos pacientes em diferentes estágios de progressão neoplásica mostraram-se

resistentes a essa abordagem devido a uma complexa resposta compensatória que mantém a indução angiogênica a partir da expressão de outros fatores (Tassi e Wellstein, 2006). Evidências experimentais indicaram que a regulação positiva do sistema FGF2/FGFR é um dos principais fatores que promovem resistência a drogas que bloqueiam VEGF, e que o controle desse sistema pode ser um mecanismo de evasão ao tratamento anti-VEGF em cânceres (Alessi *et al.*, 2009).

Desta forma, é importante identificar moléculas inibidoras e ativadoras da proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação celular, bem como da angiogênese no sentido de caracterizar seus papéis nesse processo, seus ligantes e vias de sinalização celular. Essa abordagem é vista como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de terapias visando o tratamento e prevenção de doenças dependentes de angiogênese, dentre elas o câncer (Alessi *et al.*, 2009; Carmeliet e Jain, 2011).

No caso dos melanomas, que é um tipo de tumor maligno proveniente de melanócitos, células específicas pigmentadas encontradas na camada basal da epiderme. (Kibbi *et al.*, 2016), vários fatores já foram identificados como cruciais para o crescimento, a neovascularização e a atividade metastática de melanomas, como mutações de ganho de funções dos proto-oncogenes B-RAF e N-RAS (Brose *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003; Goydos *et al.*, 2005), falta de atividade do supressor de tumor TP53 (Liu e Sheikh, 2014), ativação constitutiva da via PI3K-AKT (Figura 6) (Hennessy *et al.*, 2005) e alterações no número de cópias de DNA de genes de microRNA (miRNA) (Zhang *et al.*, 2006). Adicionalmente, alguns fatores pró-angiogênicos, especialmente o VEGFA e os FGFs, já são amplamente descritos como cruciais para a progressão da angiogênese associada a tumores, incluindo os melanomas (Bayer-Garner *et al.*, 1999; Prager *et al.*, 2012).

A expressão aumentada do fator pró-angiogênico e pró-mitótico FGF2 e de seus receptores promove um *loop* autócrino poderoso de estimulação vital para o desenvolvimento neoplásico (Presta *et al.*, 2005; Nissen *et al.*, 2007). Além disso, o FGF2 é descrito como sendo um indutor de VEGFA, de PI3K-AKT e da via RAS-RAF-MAPK (Seghezzi *et al.*, 1998; Goetz e Mohammadi, 2013), como mostrado na Figura 5, e um dos alvos mais importantes para a terapêutica de melanomas

(Graeven *et al.*, 2001; Tsunoda *et al.*, 2007; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). A via de sinalização dos fatores de crescimento de fibroblastos desempenha um papel crucial no câncer, afetando o crescimento do tumor, angiogênese, resistência aos medicamentos e fuga de terapia anti-angiogênica do VEGFA. Assim, a investigação do efeito antagonista de proteína PTX3 no sistema FGF2/FGFR4 se torna uma importante ferramenta para o tratamento de tumores associados de FGF2, como os melanomas malignos.

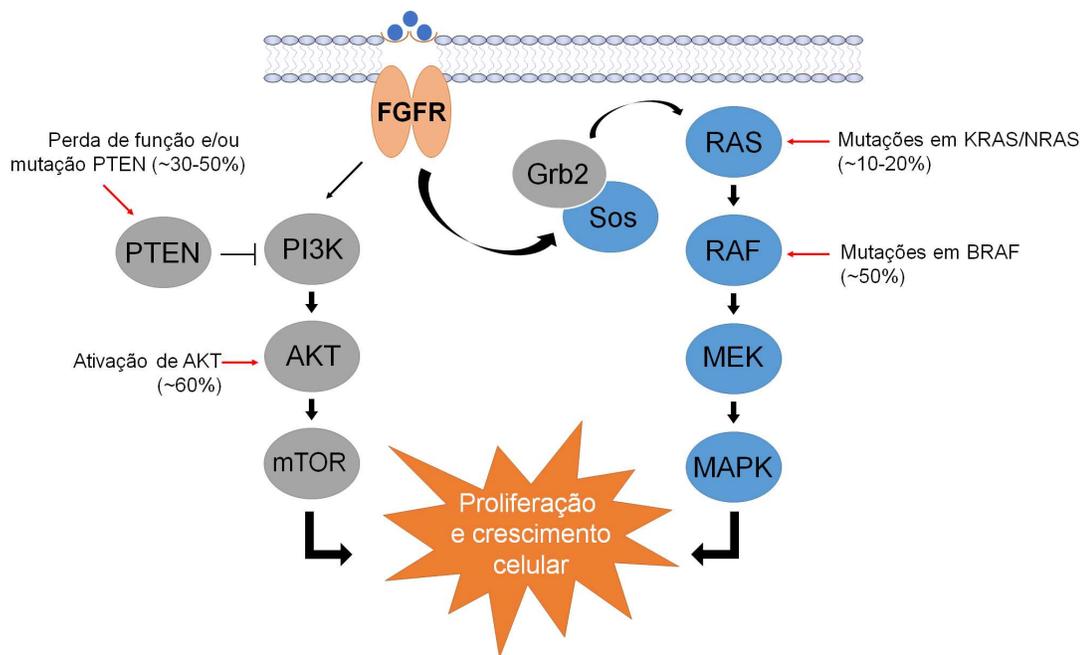


Figura 6. Esquema das vias RAS/RAF-MEK-MAPK e PI3K-AKT em melanoma.

Esquema das vias efetoras de sinalização RAF-MEK-MAPK e PI3K-AKT e as mutações que mais frequentemente ativam essas vias em pacientes com melanoma. As mutações no oncogene NRAS, encontradas em aproximadamente 10-20% dos melanomas, ativam ambas as vias efetoras. A via RAF-MEK-MAPK também pode ser ativada através de mutações no gene BRAF, encontradas em aproximadamente 50% dos melanomas. Em um subconjunto de melanomas, as MAPK quinases mostraram ser constitutivamente ativas mesmo na ausência de mutações NRAS ou BRAF. A via PI3K-AKT pode ser ativada através da perda ou mutação do gene supressor tumoral PTEN, ocorrendo em 30-50% de melanomas, ou através da amplificação do gene da isoforma AKT3. Embora a frequência exata da amplificação do gene AKT3 seja desconhecida, a quinase AKT3 é ativada constitutivamente em aproximadamente 60% dos melanomas. A ativação de MAPK e / ou AKT promove o desenvolvimento de melanoma por vários mecanismos, incluindo estimulação da proliferação celular e maior resistência à apoptose (Modificado de Chudnovsky *et al.*, 2005).

2. Justificativa e relevância

O descontrole do ciclo mitótico e proliferativo das células tumorais associado ao aumento da capacidade de migração e crescimento independente de ancoragem bem como da promoção da angiogênese favorecem o desenvolvimento, sobrevivência, invasão local e metástase hematogênica das células tumorais. A elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes a estas alterações e a identificação de novas moléculas capazes de inibi-las é, portanto, imprescindível no desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas.

Um dos mecanismos que estimula o processo tumorigênico e progressão de neoplasias é a regulação positiva dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF). A expressão alterada de FGF2 em diferentes tipos de tumores, como próstata, mama, bexiga, rim, câncer de cólon e melanomas já foi reportada. Nesses casos, a sinalização aberrante de FGF2 é crucial para o desenvolvimento tumoral, favorecendo a proliferação e resistência das células à apoptose, aumentando a motilidade e a capacidade de invasão, bem como ampliando a resistência à quimioterapia (Rusnati et al., 2004; Leali et al., 2009).

A Pentraxina-3 (PTX3) é uma glicoproteína de fase aguda pleiotrópica com funções biológicas não-redundantes na fertilidade feminina e na imunidade inata (Garlanda *et al.*, 2002; Moalli, Paroni, *et al.*, 2011; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Níveis alterados de PTX3 foram encontrados em câncer de próstata (Stallone *et al.*, 2014), lipossarcoma (Willeke *et al.*, 2006), câncer do tecido glial (Locatelli *et al.*, 2013), de pulmão (Diamandis *et al.*, 2011) e de carcinoma pancreático (Kondo *et al.*, 2013). Em 2010, foi mostrado que a organização multimérica de PTX3 promovida pelo domínio N-terminal exclusivo gera dois sítios específicos de interação proteína-proteína com o FGF2 (Inforzato *et al.*, 2010). A interação entre PTX3-FGF2 foi capaz de inibir as ações de FGF2 na angiogênese em modelos de membranas corioalantóicas de embrião de galinha, na migração de células do músculo liso aórtico e na proliferação de células de melanoma murino B16-F10 (Rusnati *et al.*, 2004). A ação antagonista de PTX3 aos efeitos biológicos do FGF2 descortina a possibilidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento de doenças dependentes de angiogênese e de neoplasias (Alessi *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2011). Entretanto, ainda não é sabida a interferência direta de PTX3 sobre

características importantes para a progressão tumoral tais como proliferação e migração celulares, crescimento independente de ancoragem, expressão gênica dos FGFs e de seus receptores, expressão de microRNAs envolvidos na regulação de proto-oncogenes da via MAPK (como MEK) e de genes supressores de tumor (como TP53) das células derivadas de vários tipos de tumores, dentre eles, os melanomas malignos, fibrosarcomas e adenocarcinoma colorretal. Também não foi esclarecido se a possível atividade atribuída à PTX3 é decorrente apenas da inativação da ação biológica dos FGFs ou abrange outros mecanismos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de PTX3 sobre a taxa de proliferação, migração, crescimento independente de ancoragem e sobre o perfil de expressão de genes e microRNAs relacionados a progressão tumoral em células neoplásicas humanas derivadas de fibrosarcoma (HT-1080), adenocarcinoma colorretal (HCT-116) e de melanoma maligno (SK-Mel-37 e SK-Mel-188).

Os resultados deste trabalho contribuirão para o melhor entendimento do papel de PTX3 na biologia dos tumores e subsidiarão novos estudos visando avaliar o papel de PTX3 na biologia dos tumores bem como seu potencial como nova molécula com atividade anti-tumoral.

3. Objetivos

3.1. Geral

Caracterizar a atividade biológica de PTX3 sobre células tumorais humanas.

3.2. Específicos

- 3.2.1. Caracterizar o padrão de expressão basal dos genes PTX3 e FGF2 nas células tumorais humanas de fibrossarcoma (HT-1080), adenocarcinoma colorretal (HCT-116) e melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188;
- 3.2.2. Avaliar as modificações promovidas pelo tratamento com a proteína PTX3 recombinante humana (rhPTX3) sobre a taxa de crescimento das células tumorais HT-1080, HCT-116, SK-Mel-37, SK-Mel-188 e do fibroblasto humano GM-637;
- 3.2.3. Avaliar as taxas de migração e crescimento independente de ancoragem nas células tumorais de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 tratadas com rhPTX3;
- 3.2.4. Analisar as modificações no padrão de expressão dos genes FGF2, FGFR1, 2 e 4, FGFBP, IL1B, TNFA, PTX3 e VEGFA promovidas nas células HT-1080, HCT-116, SK-Mel-37 e SK-Mel-188 em resposta ao tratamento com rhPTX3;
- 3.2.5. Analisar o impacto do tratamento com a proteína rhPTX3 sobre o padrão de expressão dos micro-RNAs miR-10a, miR-17, miR-21, miR-29b, miR-149, miR-150, miR-155, miR-188, miR-199a, miR-208a, miR-210, miR-214, miR-221, miR-491 nas células de melanoma humano SK-Mel-37 e SK-Mel-188;
- 3.2.6. Gerar linhagens estáveis dos melanomas humanos SK-Mel-37 e SK-Mel-188 transfectadas com o cDNA completo do gene de PTX3 humano;
- 3.2.7. Avaliar o impacto da expressão aumentada de PTX3 sobre a taxa de proliferação das células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 transfectadas com o cDNA de PTX3 humano;
- 3.2.8. Investigar o padrão de crescimento de tumores induzidos experimentalmente pela injeção de células de melanoma humano SK-Mel-37 transfectadas com o cDNA de PTX3 humano em camundongos Balb/c nude.

4. Material e métodos

4.1. Delineamento experimental

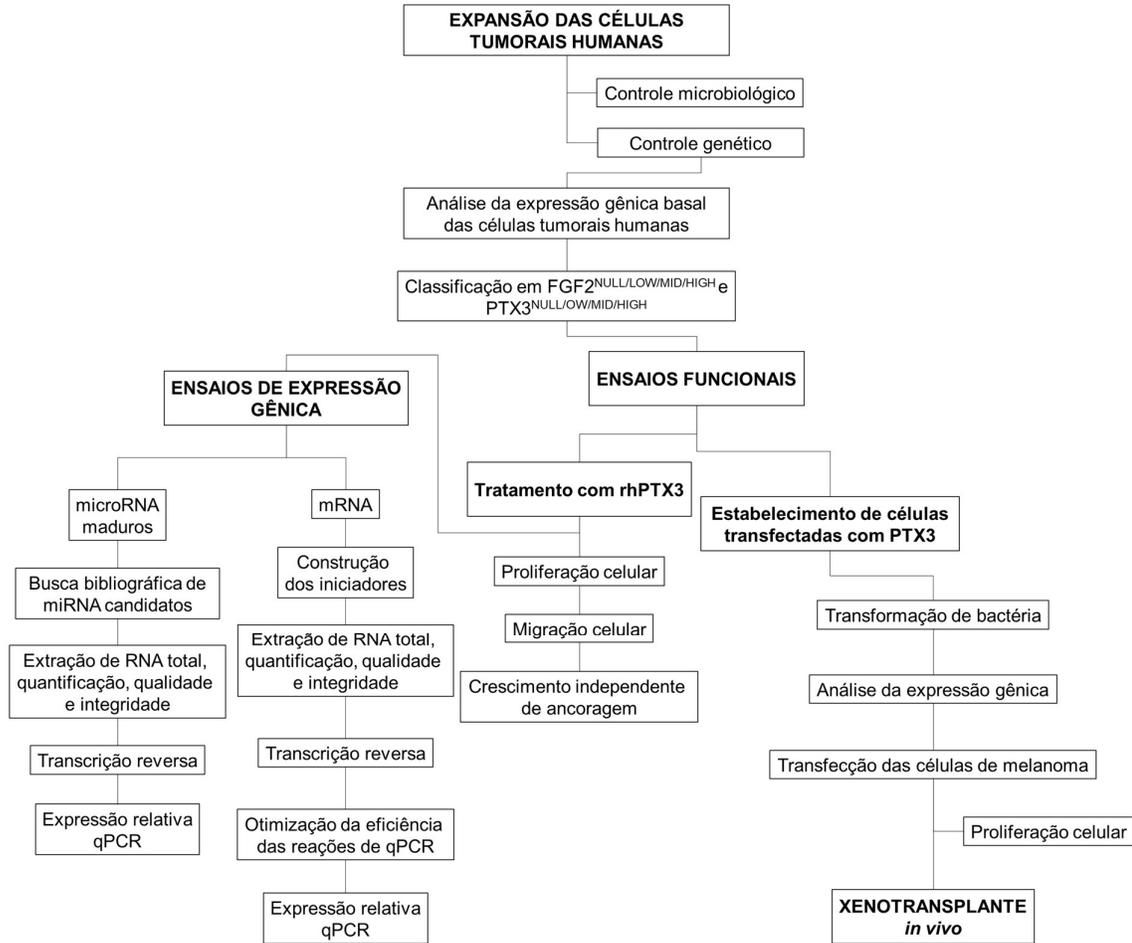


Figura 7. Fluxograma representativo do delineamento experimental da avaliação do efeito de PTX3 em células tumorais humanas.

Células provenientes de tecidos neoplásicos foram classificadas quanto ao nível de expressão basal dos genes PTX3 e FGF2 em NULL, LOW, MID e HIGH. As linhagens que expressavam FGF2 foram avaliadas quanto à proliferação e migração celular, capacidade de formação de colônia sem necessidade de ancoragem, expressão gênica de fatores pró-proliferativos (FGF2, FGFBP, FGFR1, FGFR2, FGFR4 e VEGFA), de PTX3 e de citocinas pró-inflamatórias TNFA e IL1B. As linhagens de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 também foram avaliadas quanto ao nível de expressão de micro-RNAs relacionados com a melanogênese e progressão tumoral. Também foi avaliada a taxa de proliferação celular de linhagens de melanoma transfectadas com o cDNA de PTX3. As células transfectadas foram inoculadas em camundongos atímicos *Foxn1^{nu/nu}* para análise da tumorigênese *in vivo*.

4.2. Proteína PTX3 recombinante humana

A proteína PTX3 recombinante humana (rhPTX3) foi fornecida pela pesquisadora Dra. Cecilia Garlanda (*Humanitas Clinical Institute*, Rozzano, Milão, Itália). Esta proteína foi produzida em células CHO (ovário de hamster chinês) e purificada por imunoafinidade em condições livre de endotoxinas (Rivieccio *et al.*, 2007). A pureza de PTX3 foi avaliada por SDS-PAGE e a baixa contaminação por LPS pelo ensaio LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*; < 124 pg de LPS / mg de proteína) e verificada pela ausência de estímulo para síntese de IL6 em monócitos.

4.3. Linhagens de células tumorais humanas

As linhagens humanas de fibrossarcoma (HT-1080) e adenocarcinoma colorretal (HCT-116) foram obtidas do ATCC (*American Type of Culture Collection*, código CCL-121 e CCL-247, respectivamente). As linhagens de melanoma SK-MEL-37 (RRID: CVCL_3878) e SK-MEL-188 (RRID: CVCL_6098) são provenientes do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (Nova Iorque, EUA). As células de fibroblasto humano GM-637 imortalizadas com o antígeno viral SV-40 (vírus simian 40 de *Polyomavirus maccacae*) foram gentilmente doadas pelo pesquisador Dr. Luiz Fernando Lima Reis (Hospital Sírio-Libanês). Todas as linhagens tumorais são tumorigênicas e compostas por células que crescem aderidas formando monocamada. Outras características estão listadas na Tabela 3.

Todas as células empregadas neste trabalho foram autenticadas quanto a origem humana pela comparação genômica do perfil de STR (*short tandem repeats*, Kit StemElite ID System™, INMETRO) comparado ao do banco de dados do ATCC. As linhagens utilizadas no estudo estão livres de contaminação por micoplasma e avaliações periódicas da manutenção deste status foram feitas por técnica de PCR duplex, padronizada no Laboratório de Genética Experimental (LGEX).

As células foram expandidas e lotes de células foram criopreservadas para que os experimentos fossem realizados utilizando células sempre na mesma passagem.

Tabela 3. Características das linhagens de células tumorais humanas utilizadas.

Célula	Tecido de Origem	Cariótipo	Morfologia	Meio de cultura
HT 1080	Fibrossarcoma	46 cromossomos - variando de 44-48 Presença de pseudoploidia Ocorrência da perda do cromossomo 11	Epitelial	DMEM (Gibco)
HCT 116	Carcinoma colorretal	62% das células apresentam 45 cromossomos 6,8% apresentam poliploidia 50% apresentam ausência do cromossomo Y	Epitelial poligonal	McCoy 5A (Sigma)
SK-Mel-37	Melanoma Maligno amelanocítico	BRAF V600E	Epitelial	DMEM (Gibco)
SK-Mel-188	Melanoma Maligno melanocítico	BRAF V600E	Fibroblastóide	DMEM (Gibco)

4.4. Expansão e criopreservação das linhagens de células tumorais humanas

No procedimento de descongelamento das linhagens de células tumorais humanas (Tabela 3), as ampolas contendo as células criopreservadas em nitrogênio líquido (-150 a -196 °C) foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37 °C e as células foram gotejadas em 5 ml de meio específico suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) testado quanto a contaminação por micoplasmas, vírus e endotoxinas (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 1% de antibióticos (100 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina (Sigma)) pré-aquecido a 37 °C em garrafas de cultura com 25 cm² de superfície de crescimento (T25) (TPP). Cada garrafa foi incubada em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e saturada com 5% de CO₂ (gás carbônico). Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído para remoção das células não aderidas e dos resíduos do crioprotetor DMSO (dimetil-sulfóxido; Sigma). Alternativamente, durante o descongelamento, as células eram gotejadas num tubo de fundo cônico de 15 ml esterilizado contendo 5 ml de meio

específico com 10% de FBS a 37 °C. O tubo era, então, centrifugado a 800-1200 rpm (Sorval RT-6000B, rotor H-1000B, equivalência de 134-300 x g) por 3 minutos e o sobrenadante descartado por inversão do tubo para a remoção completa do DMSO. O precipitado celular era ressuscitado em 5 ml de meio 10% FBS e a suspensão contendo as células colocada em garrafas T25 que eram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e saturada com 5% de CO₂.

Quando a monocamada celular atingia uma confluência estimada em 70 a 80%, o meio de cultura das células era removido, as células lavadas uma vez com 8 ml de PBS 1x (salina tamponada com fosfato) pré-aquecido a 37 °C para remoção completa do FBS e de *debris* celulares. O PBS era então removido e 0,5 ml de uma solução estéril contendo 0,15% de tripsina (Gibco, BRL) e 0,53 mM de EDTA (Affymetrix) pré-aquecida a 37 °C eram adicionados gota-a-gota na monocamada celular e as células incubadas por 1 a 2 minutos a 37 °C. A tripsina é uma enzima com atividade proteolítica que cliva os peptídeos no lado C-terminal de resíduos de lisina e arginina das proteínas de adesão celular e facilita o desprendimento das células das garrafas tratadas para cultura celular. A tripsina é inibida pela ação de inibidores de proteases presentes no FBS, como α_1 -antitripsina e α_2 -macroglobulina. Assim que as células começavam a desprender, a monocamada era lavada com jatos de 5 ml de meio específico contendo 10% de FBS para facilitar o desprendimento das células da garrafa e inibir a ação da tripsina.

Uma alíquota da suspensão celular era coletada e utilizada para contagem e avaliação da viabilidade celular. A contagem era feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada usando o corante vital Azul de Tripán 0,5% (Sigma). O azul de tripan é um corante impermeável pela membrana celular de células viáveis. A membrana das células não-viáveis é permeável ao Azul de Tripán tornando as células azuis na sua presença. Com base no número de células viáveis, as células eram repicadas em novas garrafas de cultura com 75 cm² (T75) ou 150 cm² (T150) de área de crescimento respeitando a taxa de repique específica para cada célula (Tabela 3). Essa expansão se fez necessária para a obtenção de quantidade de célula suficiente para o congelamento de, no mínimo, 10 ampolas contendo de 1,6 a 2,1 milhões de células por ampola. Duas alíquotas contendo 2

milhões de cada célula era utilizado para extração de DNA e verificação da contaminação por micoplasma, conforme método descrito no tópico 4.5 abaixo.

Para armazenamento, as células foram colocadas no meio específico suplementado com 50% de FBS e 10% de DMSO e estocadas em freezer -80 °C por 24 a 72 horas sendo, em seguida, transferidas para container (Locator 8 – Thermolyne) contendo nitrogênio líquido para armazenamento em longo prazo. Após uma semana, uma ampola era descongelada para a certificação da eficiência do procedimento de criopreservação.

4.5. Monitoramento da contaminação por Micoplasma

As bactérias do gênero *Mycoplasma* são uma das principais fontes de contaminação das culturas celulares e causam alterações da morfologia celular, taxa de proliferação e estabilidade genética das células, prejudicando a robustez e a confiabilidade dos resultados científicos. Devido ao tamanho pequeno (0,3-0,8 µm) e ausência de parede celular, a visualização e detecção de micoplasma em culturas celulares é uma tarefa difícil e requer técnicas precisas e rápidas. Para monitorar a presença de contaminação das células empregadas neste trabalho, -padronizamos um protocolo de PCR duplex para amplificação, na mesma reação, do gene que codifica para o rRNA (RNA ribossomal) 16S de *Mycoplasma sp.* e o gene de expressão constitutiva GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) de *Homo sapiens* a partir de DNA genômico extraído das células de interesse.

4.5.1. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Peter W. Laird (Laird *et al.*, 1991). Brevemente, cada alíquota contendo aproximadamente 2 milhões de células era centrifugada a 300 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado 3 vezes com PBS 1X. A seguir de centrifugação a 300 x g por 5 minutos para remoção de todo resquício de meio de cultura presente nas células.

Ao precipitado celular, eram adicionados 0,5 ml de tampão de lise (100 mM Tris.HCl pH 8.5, 5,0 mM EDTA, 0,2% SDS, 200 mM NaCl e Proteinase K 100 µg/ml)

e a suspensão mantida sob agitação no Thermomixer (Eppendorf) a 600 RPM por 2 horas a 37 °C. Após esse procedimento, eram adicionados 0,5 ml de isopropanol e os tubos homogeneizados por inversão até obtenção do enovelamento do DNA. As amostras eram mantidas por 5 min a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugadas por 5 min a 8600 x g para precipitação do DNA.

Após o descarte do sobrenadante, o DNA precipitado era ressuspenso com 0,5 ml de etanol 70% em água ultra-pura (Milli-Q) e a amostra centrifugada novamente a 8600 x g por 5 min. Em seguida, o sobrenadante era descartado por inversão, o precipitado incubado a 55 °C por 15 min para secagem completa e, em seguida, o DNA era diluído em 40 µl de água Milli-Q autoclavada e estocado em geladeira.

A quantificação de amostras diluídas 1:10 em água ultra-pura era feita por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) no comprimento de onda de 260 nm. Para o cálculo da concentração do DNA extraído foi utilizada a fórmula $c = (A * \epsilon) / b$ (onde, c = concentração de ácido nucleico em ng/ml. A = a absorvância em AU. ϵ = o coeficiente de extinção depende do comprimento de onda em ng-cm/ml (DNA, fator 50). b = tamanho do percurso em cm). A estimativa da contaminação por proteína e sal nas amostras foi feita pela razão de absorvância a 260/280 nm e 260/230 nm, respectivamente. Foram considerados de boa qualidade as amostras de DNA que apresentaram razão entre 1,8 e 2,2.

4.5.2. PCR duplex para identificação de micoplasma e descontaminação de linhagens contaminadas

Para realização da PCR duplex, utilizamos um par de iniciadores previamente descritos como sendo específicos para amplificação de uma região de 270 pb do gene rRNA 16S de *Mycoplasma sp.*: GPO-3 (5'-GGG AGC AAA CAG GAT TTA ATA CCC T-3 ') e MGSO (5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3') (Young *et al.*, 2010). Como controle interno da presença de DNA genômico nas amostras, foram desenhados dois iniciadores para o gene GAPDH utilizando a ferramenta *Primer3* (NCBI). Os iniciadores Fw: 5'-CTC TCT GCT CCT CCT GTT C-3' e Rv: 5'-GAT GAT GAC CCT TTT GGC TC-3' amplificam um fragmento de 437 pb

correspondente ao éxon 6 de uma região conservada do gene humano (geneBank número NC_000012.12 *Homo sapiens*). Os parâmetros como a energia livre de Gibbs (kcal/mole) e a temperatura de *melting* (° C) foram avaliados utilizando a ferramenta OligoAnalyzer (IDT/DNA) (a Tabela 4 detalha os valores aceitos para cada parâmetro).

Para otimização das reações de PCR, usamos como modelo um DNA genômico extraído de uma linhagem celular humana (SK-Mel-5) previamente conhecida como positiva para micoplasma por PCR usando os primers GPO-3 e MGSO. Foram testadas diferentes quantidades de DNA genômico (1.000 a 0,01 ng), iniciadores (0,25, 0,5, 0,75 e 1 pmol / µl), DMSO (1,0, 1,5, 2,0 e 2,5%), MgCl₂ (1,0, 1,5 e 2,0 mM) e Taq DNA polimerase (0,05 U/µl), bem como várias temperaturas de anelamento (TA) (52, 54, 56 °C para GAPDH; 58 e 60 °C para micoplasma). Em seguida, o produto da PCR era fracionado eletroforicamente a 40V durante 5 minutos seguido por 45 minutos a 110 V num gel de agarose 1,5% e 1,5x14 cm². A condição considerada como ideal foi aquela que apresentou dois amplicons independentes, sem presença de qualquer *smear* (borrão) ou bandas espúrias inespecíficas. O protocolo padronizado, usado no screening do grau de contaminação das células empregadas neste trabalho, foi o seguinte: 100 ng de DNA genômico como molde, 0,25 pmol/µl de MGSO e GPO-3, 0,75 pmol/µl de GAPDH, 1,5 mM de MgCl₂, 2% de DMSO, água ultra-pura q.s.p. (quantidade suficiente para) 25 µl e os seguintes parâmetros do termociclador: (1x 94 ° C 30 ", 40x 94 ° C 30 ", 56 ° C 1 ', 60 ° C 45", 72 ° C 1', 1x 72 ° C 7 ', 4 ° C *hold*).

Para avaliação da presença de micoplasma, as células HT-1080, HCT-116, SK-Mel-37, SK-Mel-188 e GM-637 foram cultivadas por 1 semana em meio específico sem qualquer antibiótico. Em seguida, o DNA foi extraído conforme descrito previamente e utilizado como molde para a reação de PCR. Todas as células, a exceção da SK-Mel- 37 estavam inicialmente livres de micoplasma.

Para descontaminação da linhagem SK-Mel-37, as células foram mantidas em meio específico contendo 10 µg/ml de Ciprofloxacino por 14 dias. Após os 14 dias, as células foram mantidas em meio sem antibiótico por mais uma semana e o DNA extraído para uso como molde na reação de PCR duplex. O Ciprofloxacino é

um antibiótico que pertence ao grupo das fluoroquinolonas, cujo mecanismo de ação é inibir a divisão celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas por bloquear as funções das proteínas DNA girase e topoisomerase tipo II e IV, necessárias para separar o DNA bacteriano durante a replicação (Ferrero *et al.*, 1995; Drlica e Zhao, 1997).

4.6. Avaliação do tempo de duplicação e da taxa de proliferação celular

A determinação do tempo de duplicação de cada uma das linhagens celulares foi feita para conhecimento da taxa de crescimento de cada linhagem e estimativa da quantidade de células a serem usadas em cada experimento. Para o ensaio foi empregado o método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio).

O ensaio de proliferação celular usando o MTT é baseado na capacidade das desidrogenases mitocondriais de clivarem os anéis tetrazólio do corante MTT através de enzimas oxidoredutases de membrana dependentes de NAD(P)-H, resultando na formação de cristais azuis. Estes cristais de formazan são impermeáveis à membrana plasmática e, desta forma, se acumulam no interior de células viáveis (Figura 8). A posterior adição da solução SDS + dimetilformamida lisa as células e permite a solubilização dos cristais gerando uma suspensão de cor azul cuja intensidade pode ser medida por espectrofotometria e é proporcional à quantidade de cristais formados, permitindo uma estimativa do número de células viáveis na cultura (Mosmann, 1983; Tada *et al.*, 1986). Com esse método é possível quantificar as células metabolicamente ativas e estimar, de maneira indireta, a proliferação celular com o passar do tempo.

Para determinar o duplicação celular, as linhagens de células tumorais humanas foram plaqueadas em triplicata técnica em poços de 0,95 cm² de área em placas de 96 wells contendo 100 µl de meio específico suplementado com 10% de FBS, 1% de antibióticos e 2 mM de L-glutamina em poços de (melanoma maligno SK-Mel-37 1,5 x 10⁴ células; melanoma maligno SK-Mel-188 1,0 x 10⁴ células; fibrossarcoma HT-1080 1,0 x 10⁴ células; adenocarcinoma colorretal HCT-116 2,0 x 10⁴ células e fibroblasto SV-40 GM-637 1,0 x 10⁴ células cm²). Cada linhagem foi

plaqueada em quatro placas diferentes e as placas foram incubadas em estufa de atmosfera úmida a 37 °C e com 5% de CO₂ por diferentes tempos (placas 0, 24, 48 e 72h). Após o período de incubação de cada placa, 10 µl de solução recém preparada de MTT (Sigma-Aldrich) a 5 mg/ml dissolvido em DMEM 10% FBS foi adicionado em cada poço e a incubada por mais 3 horas a 37 °C em estufa com atmosfera saturada com 5% de CO₂.

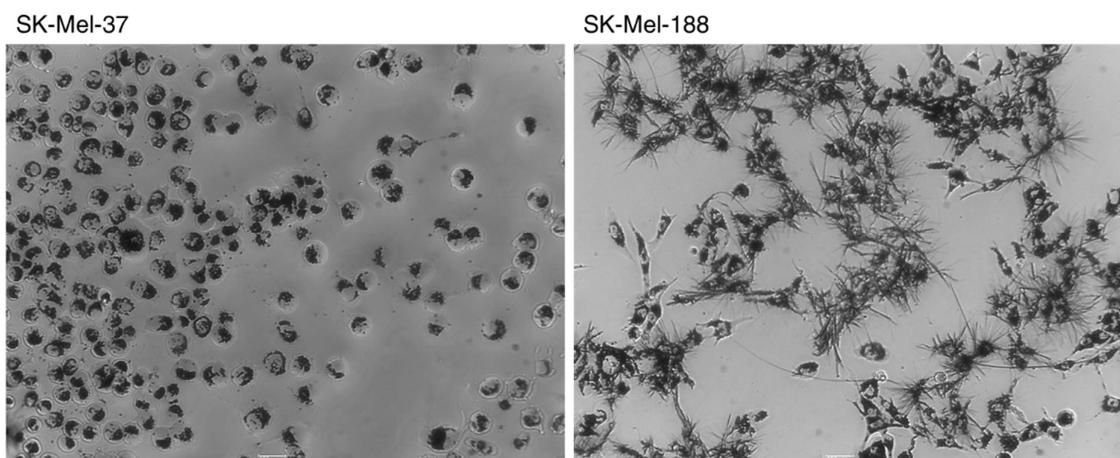


Figura 8. Aspecto dos cristais de formazan aprisionados dentro das células viáveis de melanoma.

As células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, antibióticos e glutamina em estufa 37 °C e 5% de CO₂. Em tempos determinados, ao meio DMEM foi adicionado uma solução de MTT (5 mg/ml em DMEM 10%). As micrografias mostram a aparência das culturas 3 horas após a incubação na presença do MTT. Os cristais de formazan aparecem corados em azul no interior das células sendo sua quantidade diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. Magnitude do aumento 100 X.

Após as três horas, o meio contendo o MTT foi cuidadosamente removido utilizando uma ponteira estéril de 200 µl e, em seguida, 100 µl de solução de solubilização (dimetilformamida com 20% SDS 1:1 v/v) foram adicionados em cada poço. As placas foram mantidas sob agitação a 400 rpm (thermomixer) por 2 horas para a solubilização completa dos cristais de formazan. A quantidade de formazan foi estimada através da quantificação por absorvância da luz no comprimento de onda de 595 nm utilizando o leitor de placas Anthos 2010 (Biochrom) e o valor da duplicação celular foi calculado como sendo a razão das médias das replicatas de: 24h/0h; 48h/24h e 72h/48h.

Para análise da taxa de proliferação celular em resposta ao tratamento com a proteína PTX3 recombinante humana, as células HT-1080, HCT-116, SK-Mel-37 e SK-Mel-188 foram plaqueadas em meio contendo 10% de FBS. Após 24 horas, o meio foi substituído por outro contendo 0,5% de FBS e a privação foi feita por 24 h. A privação de soro foi feita com a intenção de sincronizar o ciclo celular das células. Para a linhagem SK-Mel-37, foi adicionado rhPTX3 em concentrações que variaram de 50 ng/ml (1,25 nmol/L) a 20 µg/ml (500 nmol/L) por 48 horas para determinação da concentração de uso de rhPTX3. Em seguida, todas as células foram expostas a 10 µg/ml (250 nmol/L) de rhPTX3 por 24, 48 e 72 horas e ao fim do tratamento, foi feito o ensaio de MTT conforme já descrito.

4.7. Ensaio de Migração celular (*scratch assay*)

As células HT-1080, SK-Mel-37 e SK-Mel-188 foram plaqueadas em 500 µl de DMEM contendo 10% de FBS, 1% de antibióticos e 2 mM de L-glutamina em placas de 24 poços e mantidas em estufa com atmosfera úmida e saturada com 5% de CO₂ a 37 °C. Após as culturas apresentarem 100% de confluência, duas lesões de aproximadamente 2-mm de espessura, foram feitas em cada poço na monocamada de células com o auxílio de uma ponteira de 200 µl. Em seguida, a monocamada foi gentilmente lavada com PBS 1X pré-aquecido a 37 °C para retirada das células não aderidas, removidas pela ponteira.

As células HT-1080 e SK-Mel-37 foram tratadas com 1,0 µg/ml de Mitomicina C (MMC, *Streptomyces caespitosus*, Sigma-Aldrich) por 16 horas e as culturas de células SK-Mel-188 com 1,0 µg/ml de MMC por 8 horas. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x pré-aquecido seguido pela adição de 400 µl de DMEM 10% de FBS e 5,0 µg/ml (125 nmol/L) de rhPTX3. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ e o meio era repostado a cada dois dias por até 96 horas. Duas áreas independentes de cada lesão, em três experimentos independentes, foram fotografadas para cada célula utilizando microscópio óptico invertido de contraste de fase e câmara Motic 3.0MP.

Para análise das imagens e mensuração das áreas das lesões, inicialmente foi utilizado o método de traçar três linhas paralelas e equidistantes conectando a

borda esquerda e a borda direita de cada lesão. Entretanto, esse método se mostrou laborioso e passível de enviesamento. Por esse motivo, com o intuito de aumentar a acurácia e eliminar o viés introduzido pela delimitação manual das áreas, desenvolvemos um algoritmo denominado WH_NJ. Este algoritmo foi desenhado utilizando a linguagem do ImageJ 1.49 (Rasband, 1997-2015), de forma a permitir que a análise da área da lesão fosse feita pela medição do contraste existente entre os pixels das regiões com células e sem células. Assim, o algoritmo é capaz de calcular a área da lesão de maneira automática, rápida e sem viés do pesquisador. Comparamos a eficiência e acurácia do WH_NJ com o método manual e foi verificado que o macro é capaz de gerar dados mais robustos do que os dados obtidos pelo método manual, pois o WH_NJ calcula as áreas de maneira mais específica, contornando toda a borda da lesão. Este macro foi publicado na revista BioTechniques e encontra-se disponibilizado para acesso livre pelo site do ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/macros/WH_NJ.txt) (Nunes e Dias, 2017).

A taxa de migração celular em resposta a PTX3 foi calculada como sendo a área livre de células calculada pelo WH_NJ em razão do tempo de incubação.

4.8. Crescimento independente de ancoragem

As linhagens de melanoma SK-Mel-37 ($1,0 \times 10^3$) e SK-Mel-188 ($0,25 \times 10^3$) foram suspensas em 300 μ l de meio DMEM contendo 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina, 0,3% (SK-Mel-37) ou 0,25% (SK-Mel-188) de agarose ultra pura autoclavada (Gibco) e 5 μ g/ml de rhPTX3. A suspensão foi então aplicada em uma base de 300 μ l de ágar autoclavada 0,5% em DMEM previamente solidificada em poços de placas de 24 poços (1,8 cm² de área de superfície / poço) e a cultura foi incubada a 37 °C em estufa úmida saturada com 5% de CO₂. Duas vezes por semana, 200 μ l de DMEM contendo 10% FBS e rhPTX3 (5 μ g/ml) era adicionado ao topo da camada de agarose. Após três semanas de incubação, 45 colônias provenientes de suspensão de célula única (*single cell suspension*) de cada grupo (controle e tratado) foram fotografadas utilizando um microscópio de contraste de fase na magnificação de 100x.

Para cálculo da área das colônias, construímos um segundo algoritmo, chamado de SA_NJ, utilizando o código do ImageJ (Rasband, 1997-2015) de maneira similar ao método empregado no WH_NJ, como descrito no tópico 4.7 (página 52). O SA_NJ nos permitir calcular a área das colônias de maneira automática, reduzindo o enviesamento do pesquisador onde é empregado, tradicionalmente, a fórmula clássica $A = \pi.R.r$, sendo R o raio maior e r o raio menor das colônias. Porém esse método se mostra extremamente laborioso e em muitas das vezes as colônias não apresentam uma morfologia regular, invalidando o uso da fórmula clássica. Como descrito anteriormente para o WH_NJ, o SA_NJ também foi validado e as medições geradas por esse algoritmo conseguem contornar toda a área da colônia de maneira extremamente precisa, gerando dados mais robustos. Este macro também foi publicado no mesmo artigo na revista BioTechniques e está disponível de maneira gratuita no site do ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/macros/SA_NJ.txt) e (Nunes e Dias, 2017).

4.9. Análise da expressão gênica (mRNA)

4.9.1. Construção dos iniciadores

A construção dos iniciadores utilizados nesse trabalho atendeu a diferentes critérios com a finalidade de assegurar alta especificidade e reprodutibilidade na amplificação dos transcritos alvos. O resumo desses critérios é apresentado na Tabela 4.

Inicialmente a sequência nucleotídica dos transcritos foi submetida a uma análise de similaridade por alinhamento através do algoritmo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 2014) visando identificar a existência de diferentes transcritos relacionados a isoformas proteicas, bem como o grau de similaridade entre as sequências, assegurando que o iniciador construído possuísse regiões de anelamentos presentes em todas as isoformas do transcrito do gene alvo.

Tabela 4. Critérios utilizados para a construção dos iniciadores.

Tamanho do iniciador	16 – 23 nt ótimo 20 nt
Tamanho do produto amplificado	PCR em tempo real: 70 a 145 bp PCR convencional: 250 a 650 bp
Temperatura de <i>melting</i>	53 – 60 °C Max ≠ 1,5 °C
Conteúdo GC %	40 – 65
Junção de éxon-éxon	6 nt em 5' – 4 nt em 3'
Formação de dímeros	$\Delta G > -9.0$ kcal/mole
Formação de <i>Hairpin</i>	$-2,0 \leq \Delta G \leq 1,0$ kcal/mole
Especificidade	Anelamento a todas as isoformas

nt = nucleotídeos; ΔG energia livre de Gibbs.

Obtida a sequência de maior similaridade e identidade, foi utilizada a ferramenta Iniciador3 (NCBI) para determinar os critérios usados na construção dos iniciadores. A Refseq mRNA 9606 do banco de dados da NCBI foi utilizada para referência humana. Os critérios adotados foram:

- Tamanho do iniciador: entre 16 e 23 nucleotídeos, sendo 20 nucleotídeos considerado o tamanho ótimo. Este critério foi estabelecido para minimizar a geração de produtos inespecíficos ocasionado por ligação aleatória dos iniciadores.
- Temperatura de *melting* (T_M): iniciador preferencialmente entre 53 e 60 °C, com diferença máxima de 1,5 °C de temperatura entre os iniciadores *forward* e *reverse*.
- Conteúdo GC: entre 40 e 65% do conteúdo total de nucleotídeos da sequência do iniciador. O conteúdo GC é determinante na T_M . Esses dois critérios visam evitar a formação de estruturas secundárias, que reduzem a eficiência na geração de produtos de PCR.

- Tamanho do produto amplificado (*amplicon*): para PCR convencional entre 250 e 650 bp e para PCR em tempo real entre 70 e 145 nucleotídeos de extensão.
- Região de anelamento: preferencialmente nas regiões de junções de éxons existentes no gene molde do transcrito em, no mínimo, 6 nucleotídeos na porção 5' e 4 nucleotídeos na porção 3' da sequência do transcrito. Como a sequência genômica correspondente ao transcrito possui íntrons, o objetivo desta estratégia é assegurar que não haja amplificação do DNA genômico nas reações de PCR.
- Valores correspondentes ao *Expected* (E)-*value*: este parâmetro indica o acerto de alinhamento da sequência do iniciador ao transcrito (mRNA) de interesse no banco de dados. Quanto mais próximo do zero, mais significativo é o acerto entre as duas sequências (iniciador com a sequência do transcrito alvo).
- Formação de estruturas secundárias: As sequências candidatas dos iniciadores que tiveram melhor E-value e anelamento específico ao alvo, foram avaliadas através do algoritmo OligoAnalyzer da IDT/DNA quanto à formação de estruturas secundárias. Foram avaliados os valores de energia livre de Gibbs (ΔG) correspondentes às estruturas de grampos (*hairpin*), homodímeros (capacidade do iniciador se anelar a ele mesmo) e heterodímeros (capacidade do iniciador *forward* se anelar ao *reverse*) (Manthey, 2005). Valores de $\Delta G \geq -9$ kcal/mole foram usados como referência uma vez que, valores menores são apontados inibidores de PCR.

Todos os iniciadores utilizados neste estudo foram sintetizados pela Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) e foram produzidos em escala inicial de 25nmol e purificação padrão.

4.9.2. Extração de RNA total

As células de fibrossarcoma HT-1080, melanoma SK-Mel-37, SK-Mel-188 e adenocarcinoma colorretal HCT-116 foram plaqueadas em triplicatas em placas de 9,6 cm² de superfície de crescimento e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Em seguida, o meio específico foi substituído por um contendo 10 µg/ml de rhPTX3 e as células foram novamente incubadas por 3 horas a 37 °C, 5% CO₂. Em seguida, o RNA total das células foi extraído pelo método do TRIzol® (Life Technologies) seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante. Brevemente, o meio de cultura dos poços foi aspirado completamente e as células foram lavadas três vezes com PBS 1x pré-aquecido a 37 °C. Em seguida, o PBS 1x foi removido e 1 ml de TRIzol® foi adicionado sobre a camada celular sendo homogeneizado várias vezes até a perda da viscosidade. O conteúdo foi, então, transferido para microtubos livres de nucleases e agitado em vórtex por 30 segundos. Em cada microtubo foram adicionados 200 µl de clorofórmio (EMSURE, Merk) e a fase aquosa foi coletada após a centrifugação dos mesmos a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e a ela foram adicionados 0,5 ml de isopropanol (EMSURE, Merk). Os tubos foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugados a 12.000 x g, 10 min, 4 °C para precipitação do RNA total.

O sobrenadante foi removido e o precipitado de RNA foi lavado duas vezes com 1 ml de etanol 75% (Sigma-Aldrich) e centrifugado a 8.600 x g por 5 min a 4 °C. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi deixado secar até a evaporação completa do etanol. O RNA obtido foi ressuspendido em 20 µl de água Milli-Q tratada com 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma-Aldrich) e 1,0 µl de uma diluição ¹/₁₀ do RNA total foi utilizado para quantificação e avaliação da contaminação por proteína e sais por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230, e nm, respectivamente. Foram considerados RNAs de boa qualidade aqueles que apresentaram relação 260/280 entre 1,8 e 2,0 e 260/230 na faixa de 1,8.

A integridade do RNA total foi avaliada por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1x corado com brometo de etídeo (BrEt 0,5 µg/ml) e,

alternativamente, utilizando o equipamento Bioanalyzer conforme descrito no item 4.10.2. Foram considerados de boa integridade os RNAs nos quais foram visualizadas, de forma nítida, as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais (rRNAs) 28S e 18S, sendo que a intensidade da banda correspondente aos 28S com igual ou o dobro de intensidade das bandas correspondentes ao rRNA 18S e sem arremete típico de degradação (*smear*).

4.9.3. Transcrição reversa

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit ImProm-II™ (Promega). Alíquotas de 2,0 µg do RNA total foram incubadas a 70 °C por 10 minutos com 1,0 µl de iniciadores ancorados oligo(dT)₂₀ (0,5 mg/ml) e H₂O Milli-Q DEPC 0,1% q.s.p 5 µl. Os tubos foram mantidos no gelo por 5 minutos e, em seguida, foram adicionados à reação 4,3 µl de H₂O DEPC, 4,0 µl de tampão ImProm 5X, 3,2 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µl de mix dNTP (10 mM), 0,5 µl de inibidor de RNase RNasin (40 U/µl) e 1,0 µl da enzima ImProm RT (20 U/µl). A reação foi incubada a 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min e 70 °C por 15 min no termociclador (Corbett, Uniscience).

A qualidade da transcrição reversa foi avaliada pela amplificação, por PCR, do gene de expressão constitutiva NOTCH2, sendo considerados cDNAs de boa qualidade aqueles que apresentavam banda de 310 bp correspondente ao gene, sem sinais de inibição da reação.

4.9.4. PCR em Tempo Real – SYBR Green

O perfil de expressão gênica das células tumorais tratadas ou não com a proteína rhPTX3, foi analisado por PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos para os genes PTX3, FGF2, FGFR1, 2 e 4, IL1B, IL8 e VEGFA (Tabela 7, página 89), utilizando o sistema de fluorescência *SYBR Green Master Mix* (Applied Technologies) na plataforma ABI 7900 HT Real Time PCR (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA).

Para padronização das reações, foram feitas curvas de diluição seriadas do cDNA (1:10, 1:100 e 1:1000) de células que sabidamente expressavam os genes supracitados (Nunes, 2014) utilizando concentrações de iniciadores que variaram de

5, 10, 15, 20, 25, 30 pmol/μl. Essa curva foi feita para cada um dos genes e as reações tiveram sua eficiência (E) calculada pelo decaimento da curva de diluição (*slope*) do cDNA sobre o valor C_T (*cycle threshold* – limiar do ciclo), usando a Equação 1. Foram consideradas padronizadas aquelas condições que apresentaram eficiência de amplificação na faixa de 90-110% e com um pico único nas curvas de dissociação. Para todos os genes, foi utilizado um programa de ciclagem universal (1x 50 °C 2'; 95 °C 10'; 40x 95 °C 15', 60 °C 1'). A curva de dissociação foi obtida por etapas sucessivas de aquecimento e resfriamento (95 °C 15', 60 °C 15' e 95 °C 15').

Equação 1. Cálculo de eficiência de amplificação

$$E_{(\%)} = \left[(10)^{-\frac{1}{\text{slope}}} - 1 \right] \times 100$$

A análise da expressão gênica foi feita utilizando a diluição 1:10 das amostras de cDNA de células tratadas com rhPTX3 empregando o método de quantificação relativa normalizada para três genes de expressão constitutiva: GAPDH, HPRT1 (Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase 1) e ACTB (actina beta) e a fórmula proposta por Hellemans (Hellemans *et al.*, 2007) (Equação 2), onde NRQ é expressão relativa normalizada, $E^{\Delta Ct}$ é eficiência de amplificação dos iniciadores dos genes 1) *goi*: gene de interesse e 2) *ref0*: genes de referência (calibradores); Π é a média geométrica de *f*: total de genes de referência. Valores negativos de expressão gênica estão reportados como sendo -1 dividido pela média dos valores NRQ do grupo tratado.

Equação 2. Cálculo para expressão relativa normalizada utilizando três genes calibradores

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{\sqrt[f]{\prod_0^f E_{ref_0}^{\Delta Ct, ref_0}}}$$

4.10. Análise da expressão de micro-RNAs

As etapas referentes à análise de expressão de miRNAs foram realizadas em colaboração com a Dra. Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira e foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Alergia do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo.

4.10.1. Extração e quantificação de RNA total

Uma quantidade de 8×10^5 células das linhagens SK-Mel-37 e SK-Mel-188 foram plaqueadas em placas de 6 poços (8×10^4 células em placas com 24 poços para as replicatas 02 e 03) em meio específico (DMEM contendo 10% de FBS, 2 mM L-glutamina e 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina) e foram incubadas a 37 °C em estufa úmida saturada com 5% de CO₂. Quando a monocamada atingiu 80% de confluência, as células foram tratadas por 3 ou 24 horas com 10 µg/ml de rhPTX3. Em seguida ao tratamento, as células foram desprendidas das placas utilizando 200 µl de tripsina 0,15% - EDTA 0,53 mM pré-aquecido a 37 °C e homogeneizadas em 1 ml de meio específico. A suspensão foi transferida para microtubos esterilizados de 1,5 ml livres de nucleases e centrifugadas a 300 x g por 5 min. O sobrenadante foi completamente removido por aspiração e 500 µl de solução de estabilização de RNA (RNAlater, QIAGEN) foi adicionado ao precipitado celular para inativação de nucleases. A extração de RNA total foi feita utilizando o kit *mirVana miRNA Isolation*, com phenol (ThermoFisher Scientific).

Às amostras em RNAlater, foram adicionados 500 µl de PBS 1x esterilizado refrigerado a 4°C e os tubos foram centrifugados a 3.000 x g por 5 min para precipitação das células. O sobrenadante foi removido por aspiração e ao precipitado celular foram adicionados 300 µl de Solução de lise/ligação (*Lysis/Binding Solution*). Os microtubos foram agitados vigorosamente em vórtex por 10 segundos para lise completa das células e obtenção de um lisado homogêneo. Em seguida, foram adicionados 30 µl de um aditivo de homogeneização de miRNA (*miRNA Homogenate Additive*) e a solução foi colocada em vórtex por 10 segundos e mantidas em gelo por 10 min. Após a incubação, foram adicionados 300 µl de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (125:24:1, pH 4,5, ThermoFisher Scientific) e o microtubo foi agitado em vórtex por 30 segundos e centrifugado a

10.000 x g por 5 min à temperatura ambiente para separação das fases aquosa e orgânica.

Em seguida, aproximadamente 300 µl da fase aquosa foram aspiradas cuidadosamente e transferidas para um novo microtubo de 1,5 ml livre de DNase e RNase. A essa solução, foram adicionados 375 µl de etanol 100% a temperatura ambiente (1,25 vezes o volume da fase aquosa coletada) e a mistura lisado/etanol foi homogeneizada várias vezes por inversão. A solução foi transferida para uma coluna de filtração previamente colocada em novos microtubos de 1,5 ml livres de nucleases (tubos de coleta) e o microtubo foi centrifugado por 15 segundos a 10.000 x g a temperatura ambiente. A solução que passou pela coluna (*flow-through*) foi descartada e a coluna com o RNA foi montada no mesmo tubo de coleta. Em seguida, 700 µl da Solução 1 de lavagem (*miRNA Wash Solution 1*) foram adicionadas à coluna de filtração e o microtubo foi centrifugado por 5 a 10 segundos (*spin*). O *flow-through* foi descartado novamente e a coluna de filtração foi montada no mesmo tubo de coleta. Em seguida, foram adicionados 500 µl de solução de lavagem 2/3 (*Wash Solution 2/3*), a coluna foi centrifugada rapidamente (*spin*) no tubo e o *flow-through* foi descartado. Esse processo foi repetido mais uma vez. Após a segunda lavagem, as colunas de filtração foram transferidas para novos tubos de coleta e 100 µl de água ultrapura livre de nucleases e pré-aquecida a 95 °C foram adicionados no centro da coluna. O microtubo foi centrifugado a 10.000 x g por 30 segundos para recuperação do RNA.

O RNA obtido foi utilizado para quantificação e avaliação da contaminação por proteína e sais por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230, e nm, respectivamente. Foram considerados RNAs de boa qualidade aqueles que apresentaram relação 260/280 entre 1,8 e 2,0 e 260/230 na faixa de 1,8. A integridade do RNA total obtido foi avaliado no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc, EUA).

4.10.2. Análise da integridade do RNA total pelo Bioanalyzer

O aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc, EUA) foi utilizado para análise da integridade dos RNAs totais extraídos. Este método baseia-se na realização de uma eletroforese capilar onde são empregados fluoróforos que se intercalam aos RNAs das amostras aplicadas na matriz do gel. Após a eletroforese, o equipamento fornece eletroferogramas e calcula a integridade das amostras com base na razão de intensidade entre as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18S e 28S. O resultado é dado na forma de uma pontuação que varia de 0 a 10, chamado de *RNA Integrity Number (RIN)*. RNAs com RIN acima de 5 são considerados com qualidade, suficiente para reações de transcrição reversa e PCR, enquanto RNAs com RINs com valores maiores ou iguais a 8, são RNAs de excelente qualidade e que podem ser utilizados para reações mais exigentes, como RNAseq e arrays.

Para a eletroforese capilar no Agilent 2100 Bioanalyzer, inicialmente os eletrodos do equipamento foram descontaminados da presença de RNases usando-se, por 1 min, um chip contendo, em um dos poços, 350 µl do inibidor de RNases RNaseZAP (Agilent). Em seguida, os resíduos do RnaseZap foram removidos por lavagem, por 10 segundos com 350 µl de água ultra pura aplicados em um poço de outro chip capilar de RNA. Após a descontaminação e lavagem, um chip capilar de RNA Nano novo foi colocado na estação de preparo do chip (*chip priming station*) e 9 µl de solução gel-corante (65 µl de RNA 6000 Nano *gel matrix* filtrado contendo 1 µl de RNA 6000 Nano *dye concentrate*- ambos da Agilent) foram aplicados no poço **G** do chip. O embolo da seringa da estação de preparo do chip foi pressionado até a trava, sendo destravado após 30 segundos, permitindo a distribuição homogênea da solução gel-corante por todos os capilares do chip. Em seguida, 9 µl da solução gel-corante foram aplicados em dois novos poços nomeados G e G.

Em todos os demais poços remanescentes do chip, 5 µl do fluoróforo RNA 6000 Nano *marker* (Agilent) foram aplicados e o chip foi, então, agitado em vórtex específico para esta finalidade (IKA), e agitado a 2.000 x rpm durante 1 minuto. Uma pequena alíquota (2 µl) de cada uma das amostras do RNA total foram aquecidas a 70 °C por 2 min e 1 µl de cada amostra foi aplicado em cada poço do chip. Também

foi aplicado 1 µl de marcador de RNA no poço do chip correspondente ao ladder. O chip foi então montado no Bioanalyzer sendo o programa selecionado o *Eukaryote Total RNA Nano Series II*.

4.10.3. Transcrição reversa

Para a síntese de cDNA a partir dos miRNAs, foi utilizado a enzima MultiScribe™ *Reverse Transcriptase* (ThermoFisher Scientific), uma transcriptase reversa do vírus da leucemia murina (rMoMuLV) que é otimizada para ensaios baseados em TaqMan. Foram utilizados na síntese do cDNA iniciadores específicos para cada miRNA de interesse específicos para esta finalidade e fornecidos no Kit TaqMan microRNA Assays.

Para seleção dos miRNA maduros de interesse utilizamos como critério funções já descritas na tumorigênese, melanogênese, interação com FGF2 e PTX3, através de buscas na literatura (APÊNDICE 7) e pelo uso do software IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). Aplicando estes critérios e ferramentas foram selecionados os seguintes candidatos: miR-10a, miR-17, miR-21, miR-29b, miR0149, miR-150, miR-155, miR-188, miR-199a, miR-208a, miR-210, miR-214, miR-221, miR-491.

O sistema utilizado para quantificação dos miRNAs nas amostras foi o TaqMan e os ensaios foram adquiridos da ThermoFisher Scientific. Além dos miRNAs descritos acima, também foram usados os snoRNAs (RNA pequeno nucleolar) RNU44 e RNU48 como normalizadores de expressão.

A Tabela 5 mostra a sequência desses iniciadores e o APÊNDICE 7 lista em quais tipos de câncer a expressão alterada de cada miRNA já foi reportada.

Foi preparado 1,0 ml de um pool dos 16 iniciadores específicos para os candidatos selecionados (10 µl de cada iniciador na concentração de 5X e água ultra-pura livre de nucleases q.s.p. 1 ml). Em seguida, num microtubo gelado a 4 °C foi preparado o mix de transcrição reversa contendo 6 µl do pool de iniciadores; 0,3 µl de dNTP (100 mM); 3,0 µl da enzima transcriptase reversa MultiScribe (50 U/µl); 1,5 µl de tampão de transcrição reversa 10X; 0,2 µl de inibidor de RNase (20 U/µl); 3 µl de RNA total (480 ng) e água ultra-pura livre de nucleases q.s.p. 15 µl. O microtubo

foi centrifugado (*spin*) e mantido no gelo por 5 min. Em seguida, a reação de transcrição reversa foi feita no equipamento Veriti (ThermoFisher Scientific) usando a seguinte ciclagem: 30' 16 °C; 30' 42 °C; 5' 85 °C; *hold* 4 °C. O cDNA sintetizado foi diluído 1:10 para uso nas reação de PCR em tempo real.

Tabela 5. Lista dos miRNAs maduros candidatos.

Alvo	Código miRBase	Sequência do miRNA maduro
hsa-miR-10a-5p	MI0000266	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG
hsa-miR-17-5p	MI0002977	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU
hsa-miR-21-5p	MI0000077	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-29b-3p	MI0000105	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-miR-149-5p	MI0000478	UCUGGCUCGGUGUCUUCACUCCC
hsa-miR-150-5p	MI0000479	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG
hsa-miR-155-5p	MI0000681	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
hsa-miR-188-5p	MI0000484	CAUCCCUUGCAUGGUGGAGGG
hsa-miR-199a-3p	MI0000242	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA
hsa-miR-208a-3p	MI0000251	AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGU
hsa-miR-210-3p	MI0000286	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
hsa-miR-214-3p	MI0000290	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU
hsa-miR-221-3p	MI0000298	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
hsa-miR-491-5p	MI0003126	AGUGGGGAACCCUCCAUGAGG
Alvo	Código NCBI	Sequência do snoRNA
RNU44	NR_002750	CCTGGATGATGATAGCAAATGCTGACTGAACATGAAG GTCTTAATTAGCTCTAACTGACT
RNU48	NR_002745	GATGACCCAGGTA ACTCTGAGTGTGTGCTGATGC CATCACCGCAGCGCTCTGACC

4.10.4. PCR em tempo real - TaqMan

Todos os iniciadores e sondas para detecção da expressão de cada micro RNA específico constituíram ensaios Taqman (TaqMan microRNA Assays) fornecidos e padronizados pela Thermo Fisher Scientific, EUA, com eficiência de amplificação aproximada de 100% testada e garantida pela Life Technologies.

Foi preparado um mix de reação contendo: 0,5 µl de 20X TaqMan Micro RNA Assays; 5 µl de TaqMan Universal Master Mix II, No AmpErase UNG (2X); 1 µl do cDNA diluído 1:10 e água ultra-pura livre de nucleases q.s.p. 10 µl. A reação de PCR foi feita em placas de 384 poços no equipamento QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) programado da seguinte forma: 10' 95 °C; 40X 15" 95 °C, 1' 60 °C; *hold* 4 °C. O valor de *fold change* dos miRNAs alvos foi calculado com base nos valores de CT_s dos snoRNAs RNU48 ou RNU44 utilizando a formula de Livak e Schmittgen $2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores negativos foram reportados como sendo $-1/2^{-\Delta\Delta CT}$. A reações foram feitas em duplicata ou triplicata técnica.

4.11. Obtenção das células de melanoma humano expressando PTX3

4.11.1. Plasmídeos

A obtenção de células do melanoma SK-Mel-37 e 188 capazes de expressar níveis elevados de PTX3 foi feita pela transfecção das células com um plasmídeo de expressão (pBABE-puro) onde foi clonado o cDNA completo humano de PTX3.

Os plasmídeos utilizados neste estudo, pBABE_mock e pBABE_PTX3, nos foram gentilmente doados pelo Dr. Roberto Ronca, do Laboratório de Oncologia e Imunologia do Departamento de Medicina Molecular e Translacional da Universidade de Brescia, na Itália. O pBABE_mock constitui o vetor vazio e o pBABE_PTX3 é constituído do vetor onde a sequência correspondente ao cDNA do gene de PTX3 humano foi clonado.

O pBABE-puro (Addgene) é um vetor retroviral para clonagem e expressão do gene de interesse e que tem como marcador seletivo a puomicina. O vetor vazio possui um tamanho de 5.169 pares de base (bp), e é composto por uma sequência

5'LTR (repetição terminal longa, na posição 0-477), o sinal de empacotamento do retrovírus gama da leucemia murina de Moloney (MMLV ψ) (542-741 bp), uma região gag truncada (942-1358 bp), o promotor e a origem SV-40 (regiões 1421-1750 e 1601-1736 bp respectivamente), gene de resistência a puromicina (PuroR, 1760-2359 bp), sequência 3'LTR (2580-3049 bp), ori (origem de replicação, 3350-3948 bp), AmpR (gene de resistência a ampicilina, 4098-4958 bp) e o promotor de AmpR (4959-5063 bp) (Morgenstern e Land, 1990). O *backbone* do pBABE_puro também possui uma região chamada MSC (sítio de clonagem múltipla) que possui regiões de reconhecimento para várias enzimas de restrição, como por exemplo: HindIII, NcoI, Accl, BamHI e EcoRI (ANEXO II).

O cDNA completo de PTX3 (número de acesso no GenBank: X63613) possui tamanho de 1837 bp e foi inserido no sítio de clonagem EcoRI do pBABE (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Após a transfecção das células, o cDNA clonado, flanqueado pelas sequências LTR do plasmídeo, é reversamente transcrito em DNA (5'LTR funciona como promotor de RNA Polimerase II), que é transportado para o núcleo e integrado ao genoma do hospedeiro, preferencialmente dentro de promotores e/ou *enhancers* ativos (Lodish *et al.*, 2014; Serrao e Engelman, 2016) tornando a transfecção estável. A seleção e manutenção dos clones com transfecção estável é feita pela cultura das células em meio contendo o antibiótico puromicina, uma vez que nos transfectados, há expressão do gene de resistência a este antibiótico.

Para a preparação de quantidade suficiente dos plasmídeos para uso na transfecção das células, os plasmídeos foram eluídos, do papel do papel de filtro em que nos foram enviados, em água ultra-pura esterilizada e livre de endonucleases e 10 μ l da solução contendo 50 ng do DNA plasmidial (pDNA) foram adicionados a microtubos de 1,5 ml mantidos no gelo e contendo 200 μ l da suspensão da bactéria TOP10 quimiocompetente. As bactérias *Escherichia coli* TOP10 (ThermoFisher Scientific – características descritas na Tabela 6) nos foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética Celular e Molecular do Departamento de Biologia Geral, coordenado pelo Prof. Vasco Ariston de Carvalho.

Os microtubos foram homogeneizados gentilmente por inversão, mantidos completamente submersos no gelo por 30 minutos e em seguida, rapidamente transferidos para um termobloco pré-aquecido a 42 °C onde foram mantidos por exatamente 90 segundos sem agitação. Após, os microtubos foram rapidamente transferidos para o gelo e incubados por mais 1 minuto. Em cada microtubo, foram adicionados 800 µl do meio LB (Luria Bertani, Gibco) e a suspensão de bactérias incubada por 45 minutos no banho-maria a 37 °C para permitir a recuperação das bactérias e a expressão do marcador de resistência à ampicilina pelo plasmídeo. Em seguida, 100, 200 e 500 µl da suspensão de cada microtubo contendo as bactérias transformadas com os plasmídeos pBABE- mock e pBABE- PTX3 foram plaqueados, em triplicata, em placas de 100 x 20 mm de LB-agar contendo 100 µg/ml de ampicilina (Sigma). As placas foram incubadas em estufa seca a 37 °C por 16 horas. Bactérias TOP10 não-transformadas foram plaqueadas em meio LB-agar com ampicilina e cultivadas sob as mesmas condições como controle.

Tabela 6. Características do genótipo das bactérias *E. coli* TOP10

Característica Função

<i>hsdR</i>	para a transformação eficiente do DNA não metilado das ampliações de PCR
<i>mcrA</i>	para a transformação eficiente de DNA metilado de preparações genômicas
<i>lacZΔM15</i>	para rastreio de cor azul / branco de clones recombinantes
<i>endA1</i>	para preparações de DNA mais limpas gerando resultados melhores para aplicações <i>downstream</i> devido à eliminação de digestões inespecíficas pela Endonuclease I
<i>recA1</i>	para redução da ocorrência de recombinação inespecífica em DNA clonado

Após a incubação das placas, colônias de bactérias resistentes foram coletadas utilizando alça esterilizada calibrada para coleta (em *loop*) e transferidas para microtubos de 1,5 ml contendo 1 ml de meio LB com 100 µg/ml de ampicilina.

Os microtubos foram incubados no thermomixer a 37 °C, sob agitação vigorosa, por duas horas. Amostras das colônias coletadas foram criopreservadas em glicerol a 25% e armazenadas a -80 °C.

4.11.2. Confirmação da presença do inserto de PTX3 nas bactérias transformadas

Antes de serem armazenadas a -80 °C, um volume de 5 µl de cada clone bacteriano de pBABE- mock e pBABE- PTX3 foram coletados, diluídos em 15 µl de água ultra pura e agitados vigorosamente em vórtex por 30 segundos.

Em seguida, 2 µl desse lisado foi utilizado como molde para uma reação de PCR utilizando os seguintes iniciadores específicos para amplificação de PTX3 humano: Fw 5'-ACT CGG AAT GGG ACA AGC-3' e Rv 5'-AGG CAC TAA AAG ACT CAA GCC-3'. O mix utilizado para a PCR de PTX3 foi 1X GoTaq Flexi Buffer (Promega); 1 mM de MgCl₂; 0,25 mM de dNTP mix; 1% DMSO; 0,8 pmol/µl do iniciador PTX3_Fw; 0,8 pmol/µl do iniciador PTX3_Rv; 0,025 U/µl de Taq DNA polimerase (Phonectria) e água ultrapura q.s.p. 25 µl. O ciclo de PCR foi: 1x 95 °C 5'; 35x 95 °C 30", 55 °C 45" e 72 °C 1'; 1X 72 °C 10'. Um volume de 12 µl do produto da reação de PCR foi fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1,2% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio a 40V por 5 min e 80V por 40 min e fotografados sob luz UV. Foram consideradas bactérias transformadas aquelas que apresentassem banda de 471 bp correspondente ao cDNA de PTX3 para o grupo de bactérias que foi transformada com o vetor pBABE_PT X3 e ausência de banda para o grupo com pBABE_mock.

4.11.3. Extração do DNA plasmidial (midi-prep)

O clone 4 confirmado como transformado com o pBABE_PT X3 e clone 5 transformado com o vetor vazio (pBABE_mock) foram coletados (100 µl) e inoculados em 10 ml de meio LB contendo 100 µg/ml de ampicilina em tubos cônicos de 15 ml esterilizados. As bactérias foram incubadas por 16 horas a 37 °C sob agitação vigorosa. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2.000 x g por 10 min a 4 °C para precipitação das bactérias. O sobrenadante foi descartado de forma a deixar o precipitado de bactérias o mais seco possível. Em seguida, adicionou-se ao

precipitado de bactéria, 200 µl de solução alcalina de lise I estéril (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM EDTA pH 8,0) e a solução foi agitada vigorosamente em vórtex por 30 segundos e, em seguida, transferida para microtubos de 1,5 ml novos e esterilizados. Adicionou-se 400 µl de solução alcalina de lise II (0,2 N NaOH e 1% p/v SDS) recém preparada e mantida a TA a cada suspensão de bactéria. Os microtubos foram fechados firmemente e homogeneizados cinco vezes por inversão. Os microtubos foram mantidos no gelo e a cada um foram adicionados 300 µl da solução alcalina de lise III (5M acetato de potássio: 3 M com relação ao potássio e 5 M com relação ao acetato). Em seguida, foram homogeneizados por inversão várias vezes, incubados no gelo por 3 a 5 minutos, centrifugados a 16.000 x g por 5 min a 4 °C e 600 µl do sobrenadante foram coletados e transferidos para novo microtubo de 1,5 ml esterilizado. Adicionou-se a cada tubo, volume igual (600 µl) de uma solução 1:1 fenol:clorofórmio e a mistura foi agitada vigorosamente em vórtex por 15 segundos. Os microtubos foram centrifugados por 2 min a 16.000 x g a 4 °C e a fase aquosa cuidadosamente coletada e transferida para novo microtubo de 1.5 ml esterilizado. À fase aquosa, foram adicionados 600 µl de isopropanol a TA e a solução agitada em vórtex por 15 segundos e mantida a TA por 2 min. Centrifugou-se a solução a 16.000 x g por 5 min a TA e o sobrenadante foi removido por inversão. Em seguida, 1 ml de etanol 70% preparado em água ultra pura livre de nucleases foi adicionado ao precipitado de DNA plasmidial para lavagem. Os microtubos foram agitados em vórtex brevemente para desprendimento do precipitado e centrifugados a 16.000 x g por 2 min a TA. O etanol de cada tubo foi descartado por inversão ou aspiração cuidadosa e os microtubos mantidos abertos no thermomixer a 55 °C por 15 min para evaporação completa do etanol.

Em seguida, adicionou-se 100 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 e 0,1 mM EDTA) contendo 20 µg/ml de Rnase A livre de Dnase ao DNA plasmidial e os microtubos foram agitados em vórtex gentilmente por alguns segundos. O DNA foi diluído 1:20 em água ultra pura para quantificação conforme descrito na página 57 e a análise da expressão gênica de PTX3 foi realizada como explicado na página 68. O DNA plasmidial estoque foi armazenado a -20 °C.

4.11.4. Confirmação das construções por análise de restrição, PCR e sequenciamento

Para confirmação da presença do inserto de PTX3 no pBABE-puro/PTX3 e da sua ausência no pBABE-puro/mock, os plasmídeos e purificados foram cortados utilizando a endonuclease de restrição EcoRI que lineariza o pBABE-puro gerando um fragmento único de, aproximadamente, 5.000 bp, enquanto gera três fragmentos de, aproximadamente 5.000, 900 e 400 bp a partir da digestão do pBABE-puro/PTX3.

A reação de digestão foi preparada em tubos de 0,6 µl mantidos no gelo, onde foram adicionados 2 µl do tampão 10X da enzima de restrição (Promega), 0,2 µl de BSA (albumina de soro bovino - Promega) acetilada a 10 µg/µl, 1 µl de DNA plasmidial a 1 µg/µl e água ultra pura estéril q.s.p. 16,3 µl. Essa solução foi homogeneizada gentilmente por pipetagem e em seguida 0,5 µl da enzima EcoRI (10 U/µl - Promega) foi adicionado ao mix de digestão. A solução foi novamente homogeneizada cuidadosamente por pipetagem e os tubos foram centrifugados brevemente (*spin*). Os tubos foram incubados a 37 °C por 15 min no termociclador Veriti (Applied Biosystems) e, em seguida os produtos da reação foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1% em TAE 1X contendo 0,5 µg/ml de BrEt a 40V por 5min e 80V por 40 min, sendo as bandas visualizadas sob luz UV em fotodocumentador.

Os plasmídeos também foram avaliados por PCR utilizando iniciadores específicos para amplificação do cDNA de PTX3 humano e 10 pg de cada um dos plasmídeos (pBABE_mock e pBABE_PTX3) como molde. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito na página 68. O resultado esperado era a amplificação, somente a partir do pBABE_PTX3, de uma banda de 471 pb correspondente à amplificação a partir do anelamento dos iniciadores na sequência de PTX3 inserida no vetor.

Após a análise dos plasmídeos por restrição e PCR, uma alíquota de cada um deles foi enviada para sequenciamento pelo método de Sanger.

Todas as análises confirmaram a presença do inserto do cDNA de PTX3, na orientação e com a sequência esperada no plasmídeo pBABE_PTX3 e a sequência também correta do vetor vazio pBABE_mock. Desta forma, os plasmídeos puderam ser utilizados com segurança para a transfeção das células de mamíferos.

4.11.5. Transfecção das células de melanoma humano

Os experimentos de transfecção das células de melanoma foram realizados em colaboração com o Dr. Leonardo Camilo de Oliveira, pós doutorando supervisionado pelo Dr. Cláudio Bonjardim, no Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG.

Inicialmente, foi feita uma curva de morte das células de melanoma que foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de FBS e 2,0 mM de L-glutamina em presença de concentrações progressivas de puromicina (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 $\mu\text{g/ml}$). A análise da morte celular se deu utilizando um microscópio ótico de contraste de fase na magnificação de 40 e 100X. A concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$ para SK-Mel-37 e de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para SK-Mel-188 de puromicina matavam todas as células das respectivas linhagens em 48 horas e foram, portanto, escolhidas para serem usadas na etapa de seleção dos clones com transfecção estável.

A outra etapa que precedeu a transfecção foi a verificação da capacidade das células de formarem colônias estáveis a partir de uma única célula. Para isso, as células de melanoma de cada uma das linhagens foram ressuspendidas em meio DMEM com 10% de FBS e 2 mM de L-glutamina de forma que se obtivesse 0,6 células por 100 μl de meio. Em seguida, esses 100 μl de suspensão de cada tipo de célula foram plaqueados em cada um dos poços de uma placa com 96 poços e os poços que apresentaram células únicas foram monitoradas por aproximadamente um mês para verificação de formação de colônias. Tanto as células SK-Mel-37 quanto 188 mostraram capacidade de expansão clônica e, portanto, foram submetidas ao procedimento de transfecção.

As células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 foram plaqueadas em placas de 24 poços (1×10^5 células / poço) em 500 μl de meio específico DMEM contendo 10% FBS e 2 mM de L-glutamina, sem antibióticos e mantidas a 37 °C em estufa com atmosfera úmida e saturada com 5% de CO₂. Quando as culturas atingiram 80% de confluência, o meio foi aspirado e as monocamadas lavadas com 500 μl de PBS 1X esterilizado pré-aquecido a 37 °C. Após a remoção do PBS foram adicionados 200 μl de meio específico com a solução de transfecção contendo volumes variados de: *Effectene Transfection Reagent* (Qiagen) (2,5, 5 e 7,5 μl), DNA plasmidial e

Enhancer (Qiagen) na proporção 1 por 8 (0,05, 0,1, 0,2 e 0,4 µg de DNA plasmidial em 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 µl de *Enhancer*, respectivamente) em tampão EC (Qiagen). As células foram cultivadas, nas condições descritas, por 3 dias em estufa úmida e saturada com 5% de CO₂ a 37 °C e em seguida o meio foi completamente removido, cuidadosamente, por aspiração e 500 µl de meio seletivo DMEM contendo 10% de FBS e puromicina (1 µg/ml para SK-Mel-37 e 0,5 µg/ml para SK-Mel-188, Gibco) foi adicionado. As células foram, então, novamente mantidas em estufa e incubadas por 1 semana a 37 °C. Em seguida, o meio foi cuidadosamente removido e substituído por mais 500 µl do meio seletivo e as células incubadas em estufa por um mês para expansão das colônias resistentes.

Assim que a monocamada formada pelas células resistentes a puromicina atingiu aproximadamente 40% de confluência, as células foram sub-cultivadas e transferidas para garrafas de cultura esterilizadas e livres de pirógenos com superfície de 12,5 cm² contendo 5 ml de meio seletivo. As células foram, então, expandidas, alíquotas foram criopreservadas conforme descrito previamente e uma alíquota de 1 x 10⁶ células foi utilizada para análise da expressão gênica de PTX3 seguindo o mesmo protocolo descrito nos tópicos 4.9.2 e 4.9.3 (páginas 57 e 58, respectivamente). A reação de PCR em tempo real para o gene de PTX3 está descrito na página 58.

4.11.6. Proliferação celular das células transfectadas

O ensaio de proliferação usando MTT também foi empregado utilizando as células de melanoma transfectadas com o plasmídeo vazio (pBABE_mock) e com o plasmídeo contendo o cDNA completo de PTX3 (pBABE_PTX3): SK-Mel-37_pBABE_mock, SK-Mel-37_pBABE_PTX3, SK-Mel-188_pBABE_mock e SK-Mel-188_pBABE_PTX3. As células de melanoma SK-Mel-37 (1,5 x 10⁴) e SK-Mel-188 (1,0 x 10⁴) tipo selvagem (WT), mock e PTX3 foram plaqueadas em meio DMEM contendo 10% de FBS e antibióticos (100 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina para o tipo WT e 0,5 ou 1 µg/ml de puromicina para mock e PTX3) em seis replicatas técnicas em quatro placas diferentes (0, 24, 48 e 72H). O método de quantificação da proliferação celular foi o mesmo empregado para as células tratadas com rhPTX3 descrito no tópico 4.6, página 50 e o cálculo da proliferação

relativa ao tempo foi feito utilizando o valor de absorbância dos tempos 24h/0h, 48h/0h e 72h/0h.

4.12. Xenotransplante experimental

O efeito biológico da expressão aumentada de PTX3 na progressão dos melanomas foi avaliado *in vivo* utilizando o modelo de camundongos atímicos Balb/c nude (*Foxn1^{nu}*) e as células tumorais de melanoma humano SK-Mel-37 transfectadas com o vetor retroviral pBABE_puro contendo o cDNA completo de PTX3 (pBABE_PTX3). O modelo murino Balb/c nude é amplamente utilizado em experimentos de xenotransplante tumoral, pois estes animais possuem uma mutação genética no gene FOXP1 (*Forkhead box protein N1*) que causa deterioração ou ausência do timo, levando a uma deficiência na produção de linfócitos T maduros e defeitos parciais no desenvolvimento de células B. Por não possuírem células T CD4⁺ e CD8⁺, a resposta imune mediada por células não é ativada, não havendo rejeição de xenoenxertos.

Todos os procedimentos empregando os animais só tiveram início após a aprovação do protocolo experimental pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, protocolo de número: 352/2016 (ANEXO I). Os animais Balb/c nude são SPF (livre de patógeno específico) e foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Foram utilizados neste estudo machos homocigotos *Foxn1^{nu/nu}* com 12 semanas de idade e pesando entre 24-30 g, mantidos em sala limpa, em micro-isoladores autoclavados mantidos em racks ventiladas no biotério do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG, sob regime de 12 horas de luz / 12 horas de escuro, recebendo água e ração esterilizados *ad libitum*.

As células de melanoma SK-Mel-37 transfectadas com o vetor retroviral pBABE_mock e pBABE_PTX3 foram expandidas em meio DMEM contendo 10% de FBS e 1 µg/ml de puomicina até a obtenção de células viáveis suficientes para a aplicação de 3 milhões de células por flanco de cada animal. A contagem de células viáveis se deu em câmara de Neubauer e utilizando o corante vital Azul de Tripan para avaliação da viabilidade celular conforme descrito anteriormente. Foram

utilizadas para indução de tumores, somente suspensões de células com viabilidade celular maior que 90%, conforme Equação 3.

Equação 3. Cálculo de células viáveis utilizando Azul de Tripán.

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\# \text{ de células viáveis (não coradas)}}{\# \text{ total de células}} \times 100$$

Na indução experimental dos tumores nos camundongos, as células foram injetadas subcutaneamente em volume 100 µl de suspensão em PBS 1X esterilizado por sítio de inoculação, usando-se agulha de 27,5 G e seringa descartável de 1,0 ml, na região dorso-lombar direita e esquerda de cada animal. O peso dos animais foi medido com uma balança e as medições do comprimento (diâmetro maior = D) e da largura (diâmetro menor = d) dos tumores foram realizadas utilizando um paquímetro inicialmente a cada cinco dias e, posteriormente cada 2 dias. O volume tumoral foi calculado utilizando a fórmula: $(D \times d^2)/2$ e o *end point* para as curvas de crescimento foi definido pelo tamanho máximo de 2,0 cm de um dos diâmetros dos tumores (Iacuc, 2009) e pela avaliação do índice de condição corpórea (BCS) do animal. Quando um dos diâmetros dos tumores apresentou tamanho igual a 2,0 cm, os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia com cetamina e xilasina (300 mg/kg e 30 mg/kg intraperitoneal – i.p.) e os tumores imediatamente extraídos e pesados.

4.13. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram executadas usando o pacote estatístico Prism 6 (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA) para a plataforma Microsoft Windows 10. Para dois grupos de amostras, usamos teste t de *Student* para dados não pareados. Para mais de dois grupos de amostras, os dados foram analisados usando análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Sidak. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para aferir índice de normalidade das amostras. Para análise da curva de crescimento tumoral foi empregado o ANOVA two way com pós-teste de Sidak e os valores foram representados como sendo a média (\bar{X}) \pm erro padrão da média (S.E.M). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

5. Resultados

5.1. Tempo de duplicação das de células tumorais

Observamos que a cultura das células SK-Mel-37 de melanoma maligno, nas condições experimentais testadas (plaqueamento inicial de $1,5 \times 10^4$ células / $0,95 \text{ cm}^2$), atingiu rapidamente a fase *log* de crescimento e houve um duplicação do número de células num período inferior a 24 horas logo após o plaqueamento, pois em 24h foi observado um aumento de 3,5 vezes no número de células (Figura 9A). Nos tempos de 48 e 72 horas, a taxa de aumento no número de células foi reduzida para 1,4 e 1,1 vezes respectivamente, indicando que a fase *plateu* havia sido atingida, provavelmente em decorrência da inibição por contato pois nestes tempos a confluência da monocamada celular foi estimada em 100% (Figura 9A).

O número de células em cultura da linhagem de melanoma maligno SK-Mel-188 (plaqueamento inicial de $1,0 \times 10^4$ células / $0,95 \text{ cm}^2$) dobrou em intervalos de 24h: aumentou 2,05 vezes de 0 para 24h e 1,8 vezes entre 24 e 48 horas (Figura 9B). Após 72 horas de cultivo, 90% da área disponível para crescimento celular havia sido preenchida e a taxa de crescimento caiu para 1,28 vezes em relação ao tempo de 48h (Figura 9B).

A linhagem de fibrossarcoma humano HT-1080 (plaqueamento inicial de $1,0 \times 10^4$ células / $0,95 \text{ cm}^2$; Figura 9C) manteve-se em fase *log* de crescimento nas primeiras horas após o plaqueamento, e o número de células dobrou a cada 24h (razões de 2,1 e 1,9 entre o número de células nos tempos 0 e 24h e 24 e 48h, respectivamente). Em 72h o número de células em cultura atingiu um *plateu* (razão entre o número de células em 48 sobre 72h = 1,12) e, neste tempo, a monocamada celular havia atingido 95% de confluência.

Na Figura 9D, podemos observar que o mesmo padrão de crescimento dos fibrossarcomas foi observado para a linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116 ($2,0 \times 10^4$ células plaqueadas / $0,95 \text{ cm}^2$), onde o duplicação do número de células ocorre a cada 24 horas (razão de 2,08 e 2,4 do número de células nos tempos 0 e 24h e 24 e 48h, respectivamente) tendo a taxa de proliferação atingido

um *plateau* em 72 horas (confluência da monocamada estimada em 100% neste tempo).

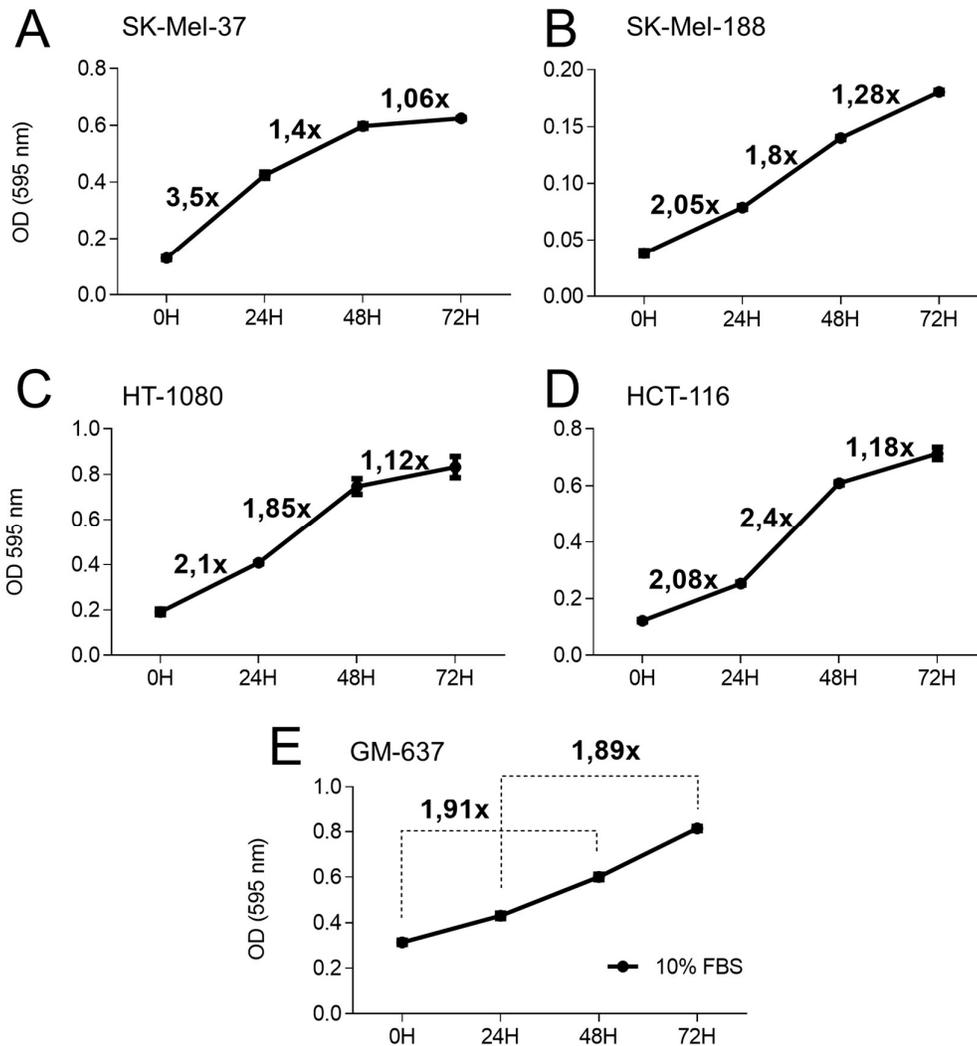


Figura 9. Análise do tempo de duplicação das linhagens de células humanas cultivadas *in vitro*

As células foram plaqueadas em 100 μ l de meio de crescimento específico contendo 10% de FBS em placas de 96 poços (0,95 cm^2 /poço). O tempo de duplicação foi estimado pelo ensaio do MTT e os valores de foram considerados como sendo a razão das absorbâncias dos tempos 24h/0h; 48h/24h e 72h/48h para as células tumorais e como sendo 48h/0h e 72h/24h para GM-637. **A)** Melanoma maligno SK-Mel-37; número de células plaqueadas = $1,5 \times 10^4$; **B)** Melanoma maligno SK-Mel-188; número de células plaqueadas = $1,0 \times 10^4$; **C)** Fibrossarcoma HT-1080; número de células plaqueadas = $1,0 \times 10^4$; **D)** Adenocarcinoma colorretal HCT-116; número de células plaqueadas = $2,0 \times 10^4$; **E)** Fibroblasto imortalizado GM-637; número de células plaqueadas = $1,0 \times 10^4$ células.

O fibroblasto humano GM-637 imortalizado ($1,0 \times 10^4$ células plaqueadas / $0,95 \text{ cm}^2$) possui uma taxa de duplicação celular de 48 horas, observado pelos valores de razão de 1,91x e 1,89x obtidos a partir do número de células contados nos tempos de 48 em relação ao tempo zero, 72 em relação a 24h respectivamente. A monocamada apresentou 90% de confluência no tempo de 72 horas (Figura 9E).

5.2. Avaliação do perfil de expressão gênica basal de FGF2 e PTX3

Durante o mestrado, foi avaliado por RT-PCR o perfil de expressão gênica basal dos genes FGF2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GAPDH nas linhagens tumorais utilizadas neste estudo (Nunes, 2014). Observamos que embora todas as células expressassem FGF2, os níveis de expressão pareciam ser diferentes. Portanto, agora, por RT-PCR em tempo real buscamos quantificar os níveis de expressão de FGF2 e PTX3 nas linhagens de estudo, classificando-as, de acordo com os níveis relativos de transcritos em FGF2^{LOW / MID} ou HIGH e PTX3^{LOW / MID} ou HIGH com base nos valores de C_T (*cycle threshold*) onde foram considerados como sendo NULL valores de $C_T \geq 35$, LOW entre 30 e 35, MID entre 30 e 20 e HIGH ≤ 20 .

A Figura 10 mostra os valores de C_T obtidos para cada linhagem e a células foram assim classificadas: HT-1080 FGF2^{MID}/PTX3^{HIGH}; HCT-116 FGF2^{MID}/PTX3^{MID}; SK-Mel-37 FGF2^{MID}/PTX3^{MID} e SK-Mel-188 FGF2^{LOW}/PTX3^{LOW}. Nenhuma das linhagens foi classificada como sendo FGF2^{NULL} ou PTX3^{NULL}.

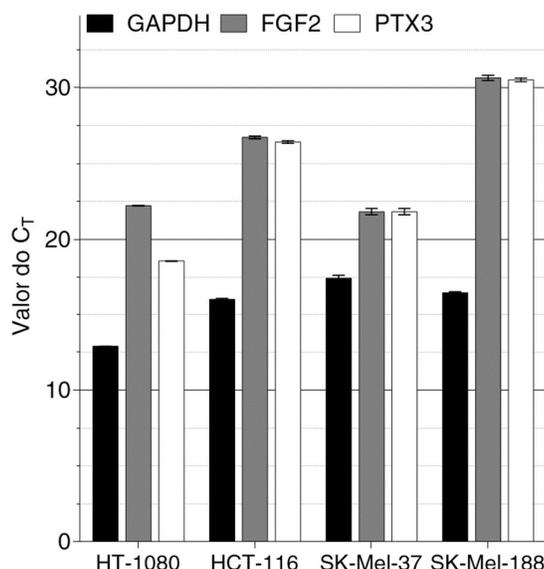


Figura 10. Análise da expressão gênica basal de FGF2 e PTX3 nas linhagens tumorais humanas

As linhagens de células tumorais humanas provenientes de sarcoma (HT-1080), adenocarcinoma colorretal (HCT-116) e melanoma maligno (SK-Mel-37 e SK-Mel-188) foram analisadas quanto ao nível de expressão dos genes FGF2 e PTX3 por RT-PCR de forma a identificar quais células expressam estes genes constitutivamente no trabalho de mestrado de autoria própria (Nunes, 2014). Neste trabalho, foram as células que expressaram FGF2 foram avaliadas por RT-PCR em tempo real quanto ao nível de expressão de PTX3 e FGF2 para classificação em PTX3^{LOW, MID} ou HIGH e FGF2^{LOW, MID} ou HIGH.

5.3. Efeito da rhPTX3 sobre a proliferação das células tumorais

Foi observado que na linhagem de melanoma SK-Mel-188 (FGF2^{LOW}/PTX3^{LOW}) o tratamento com a rhPTX3 inibiu a proliferação celular desta linhagem nos tempos 24, 48 e 72 horas apenas em alta concentração de FBS (10%) (Figura 11A). Nas células de melanoma SK-Mel-37 (FGF2^{MID}/PTX3^{MID}) houve uma resposta inibitória da proliferação celular em resposta ao tratamento com a proteína rhPTX3, tanto em condições de baixa concentração de FBS (2%), quanto em alta concentração de FBS (10%) nos tempos 48 e 72 horas (Figura 11B).

Na linhagem celular de fibrossarcoma HT-1080 FGF2^{MID}/PTX3^{HIGH}, a qual já expressa constitutivamente tanto FGF2 quanto PTX3, foi observado que o tratamento com a rhPTX3 não afeta a proliferação em nenhuma condição de soro

(Figura 12). A proliferação da linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116 (FGF2^{MID}/PTX3^{MID}) que expressa todos os receptores de FGF e também o ligante FGF2 de forma constitutiva também não foi afetado pelo tratamento com a proteína PTX3 recombinante humana (Figura 13). O mesmo efeito foi detectado na linhagem de fibroblasto humano GM637 imortalizado pelo antígeno T do vírus SV-40. A proteína rhPTX3 (10 µg/ml) não inibiu a proliferação de GM-637 em nenhum dos tempos e condições de FBS (2 e 10%) (Figura 14).

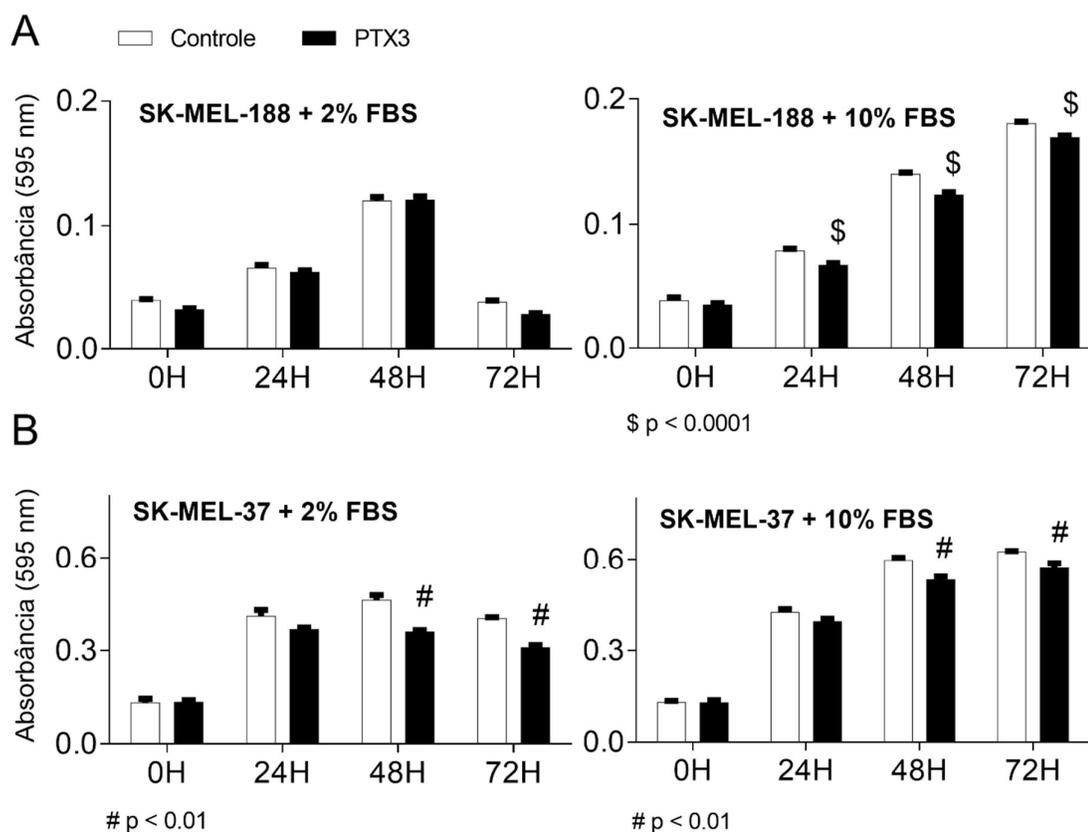


Figura 11. Análise do efeito do tratamento com a rhPTX3 sobre a proliferação das células de melanoma SK-Mel-188 e SK-Mel-37

As linhagens de melanoma foram plaqueadas em 100 µl de meio DMEM contendo 10% de FBS, 2 mM L-glutamina e 1% de antibióticos. Após 24 horas, as células foram privadas de FBS (0,5%) por mais 24 horas seguido do tratamento com a rhPTX3 (10 µg/ml) na presença de baixa (2%) e alta (10%) concentração de FBS por 24, 48 e 72 horas. A proliferação celular foi estimada pelo ensaio de MTT. Taxas de proliferação celular no melanoma SK-MEL-188 FGF2^{LOW}/PTX3^{LOW} (**A**) e no melanoma SK-MEL-37 FGF2^{MID}/PTX3^{MID} (**B**). Valor p foi calculado usando ANOVA 2 way com pós-teste de Sidak. N = 3 experimentos independentes realizados em triplicatas.

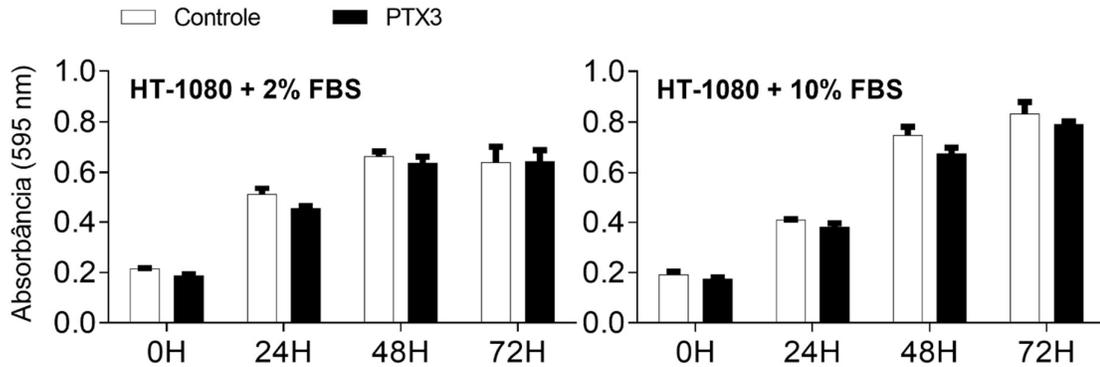


Figura 12. Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 sobre a proliferação celular da linhagem HT-1080

A linhagem HT-1080 FGF2^{MID}/PTX3^{HIGH} foi plaqueada em meio DMEM contendo 10% de FBS. Após 24 horas, as células foram privadas de FBS (0,5%) por mais 24 horas e o tratamento com rhPTX3 (10 µg/ml) foi feito na presença de baixa (2%) e alta (10%) concentração de FBS por 24, 48 e 72 horas. A proliferação celular foi estimada pelo ensaio de MTT. Valor p foi calculado usando ANOVA 2 way com pós-teste de Sidak. N = 3 experimentos independentes.

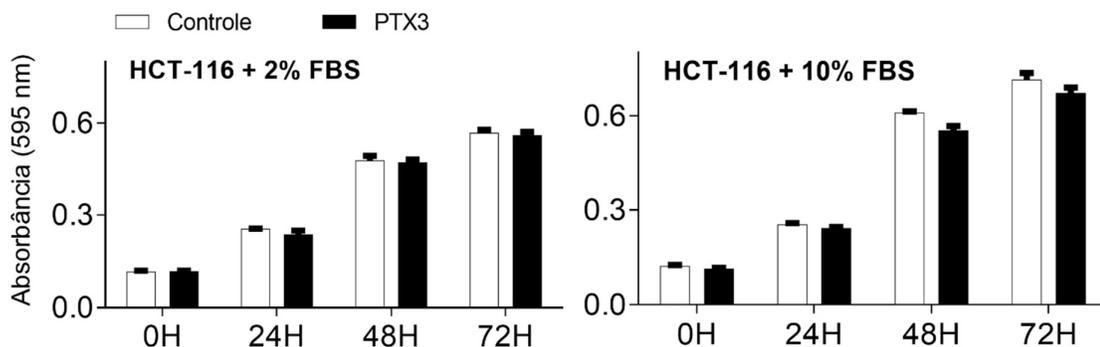


Figura 13. Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 sobre a proliferação celular da linhagem HCT-116.

A linhagem HCT-116 FGF2^{MID}/PTX3^{MID} foi plaqueada em meio McCoy 5A contendo 10% de FBS. Após 24 horas, as células foram privadas de FBS (0,5%) por mais 24 horas e o tratamento com rhPTX3 (10 µg/ml) foi feito na presença de baixa (2%) e alta (10%) concentração de FBS por 24, 48 e 72 horas. A proliferação celular foi estimada pelo ensaio de MTT. Valor p foi calculado usando ANOVA 2 way com pós-teste de Sidak. N = 3 experimentos independentes.

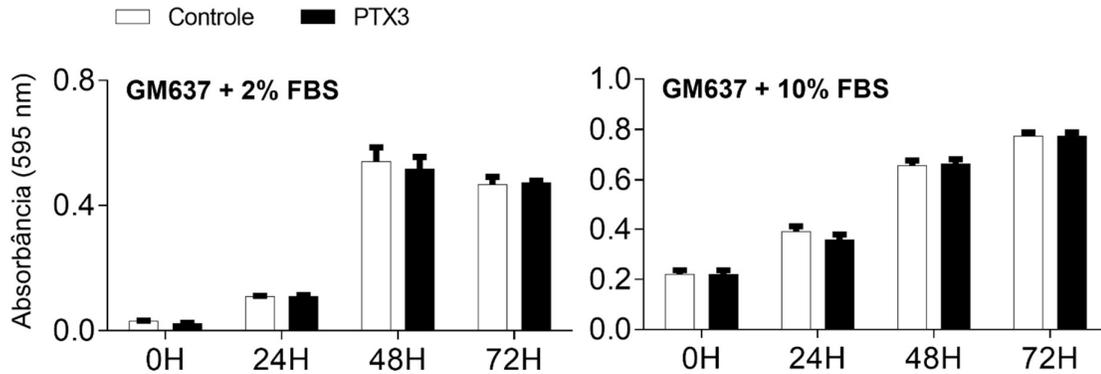


Figura 14. Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 sobre a proliferação celular da linhagem GM637.

A linhagem de fibroblasto imortalizado GM637 foi plaqueada em meio RPMI 1640 contendo 10% de FBS. Após 24 horas, as células foram privadas de FBS (0,5%) por mais 24 horas e o tratamento com rhPTX3 (10 µg/ml) foi feito na presença de baixa (2%) e alta (10%) concentração de FBS por 24, 48 e 72 horas. A proliferação celular foi estimada pelo ensaio de MTT. O valor p foi calculado usando ANOVA 2 way com pós-teste de Sidak. N = 3 experimentos independentes.

5.4. Efeito de rhPTX3 sobre a taxa de migração celular

Avaliamos o efeito de rhPTX3 sobre a migração das células tumorais humanas pelo modelo de “lesão-regeneração” (*wound healing assay*). Foram feitas duas lesões em cada um dos poços das células em monocamadas confluentes das células utilizando uma ponteira estéril de 200 µl a fim de se obter uma área livre de células com aproximadamente 2 mm de largura (lesão) e a migração foi acompanhada em relação ao tempo até o fechamento total da monocamada (regeneração). A mitomicina C (MMC), um inibidor da mitose, foi utilizado para eliminar o viés causado pela proliferação celular sobre a taxa de regeneração da lesão.

O tratamento com a proteína recombinante hPTX3 foi capaz de inibir a taxa de migração celular nas linhagens de melanoma humano SK-Mel-188 FGF2^{LOW}/PTX3^{LOW} e SK-Mel-37 FGF2^{MID}/PTX3^{MID}. Na Figura 15A é mostrada as diferenças estatísticas entre a regeneração das lesões feitas na monocamada da cultura da linhagem SK-Mel-188, onde podemos perceber que o efeito do retardo na regeneração causado pelo tratamento com rhPTX3 ocorre apenas no tempo de 72 horas (Controle: \bar{X} 96,8 ± 1,35% S.E.M e PTX3: 80,8 ± 7,74%; n=6). Nos grupos que

foram submetidos ao tratamento com MMC, foi possível observar o efeito inibitório da rhPTX3 sobre a migração celular tanto no tempo de 72H (MMC: $69,29 \pm 8,41\%$ e MMC+PTX3: $43,88 \pm 3,78\%$; n=6) quanto no de 96H (MMC: $84,72 \pm 5,14\%$ e MMC+PTX3: $58,41 \pm 5,57\%$; n=6). Os valores estão sendo representados como sendo a média (\bar{X}) das replicatas de cada grupo \pm S.E.M - erro padrão da média.

Na lesão causada na monocamada da linhagem SK-Mel-37 FGF2^{MID}/PTX3^{MID} constatamos efeito inibitório sobre a migração celular apenas quando nas células tratadas com MMC+PTX3 em comparação com o grupo controle sem mitomicina nos tempos 48H (controle: \bar{X} $88,35 \pm 4,25\%$ S.E.M; MMC+PTX3: $64,8 \pm 0,78\%$; n=6) e 72H (controle: $91,82 \pm 4,3\%$; MMC+PTX3: $65,04 \pm 3,25\%$; n=6) e do grupo com MMC em relação ao grupo controle, também nos tempos 48H (controle: $88,35 \pm 4,25\%$; MMC: $70,1 \pm 4,5\%$; n=6) e 72H (controle: $91,82 \pm 4,3\%$; MMC: $74,27 \pm 5,22\%$; n=6). Com relação as taxas de migração celular das células de fibrossarcoma humano HT-1080 FGF2^{MID}/PTX3^{HIGH} não foi possível identificar diferença estatística entre as áreas das lesões provenientes do grupo controle e do grupo tratado com a proteína rhPTX3 (5,0 μ g/ml) em nenhum dos tempos analisados sob quaisquer das condições testadas (Figura 16).

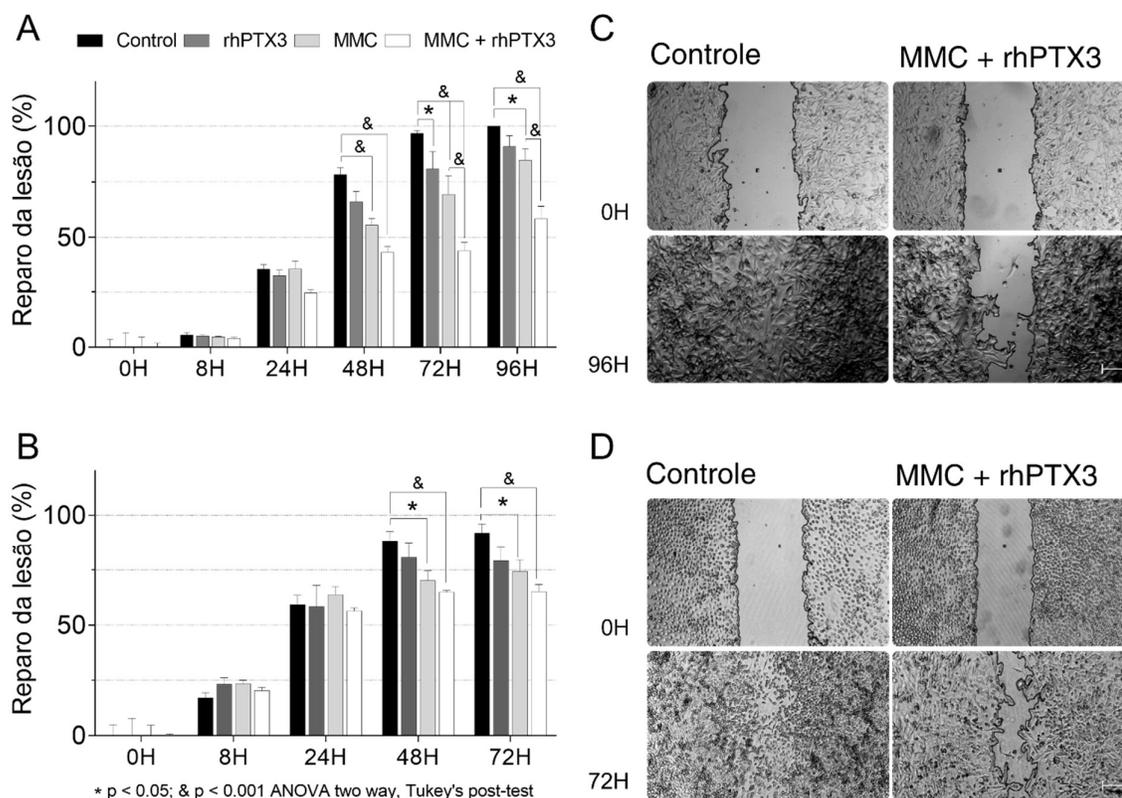


Figura 15. Efeito de rhPTX3 na migração das células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188

As células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 foram cultivadas em placas de 1,8 cm² até que atingissem 100% de confluência quando duas lesões de aproximadamente 2 mm de comprimento foram feitas na monocamada celular utilizando uma ponteira de 200 µl. As células foram então cultivadas em DMEM 10% FBS na presença de 1,0 µg/ml de MMC (Mitomicina C) por 8 horas (SK-Mel-188) ou 16 horas (SK-Mel-37) em estufa a 37 °C, 5% CO₂. Após o tratamento, o meio foi removido, a monocamada foi lavada com PBS1X para remoção da MMC e as células foram cultivadas em meio contendo 5,0 µg/ml de rhPTX3 que era renovado a cada 48 horas. Gráficos representativos de seis replicatas mostram o progresso da regeneração da lesão na monocamada da cultura das células SK-Mel188 (A) e SK-Mel-37 (B) na presença e ausência de rhPTX3, MMC ou combinação de rhPTX3 e MMC. Micrografias representativas de seis replicatas das lesões na monocamada da cultura dos melanomas SK-Mel-188 (C) e SK-Mel-37 (D) mostram a área da lesão após o tempo de 96 e 72 horas, respectivamente. Valor p foi calculado usando ANOVA 2 way com pós-teste de Sidak, onde * p < 0,05 e & p < 0,001. N = 3 experimentos independentes. Barra de escala: 250 µm. Magnificação: 40X.

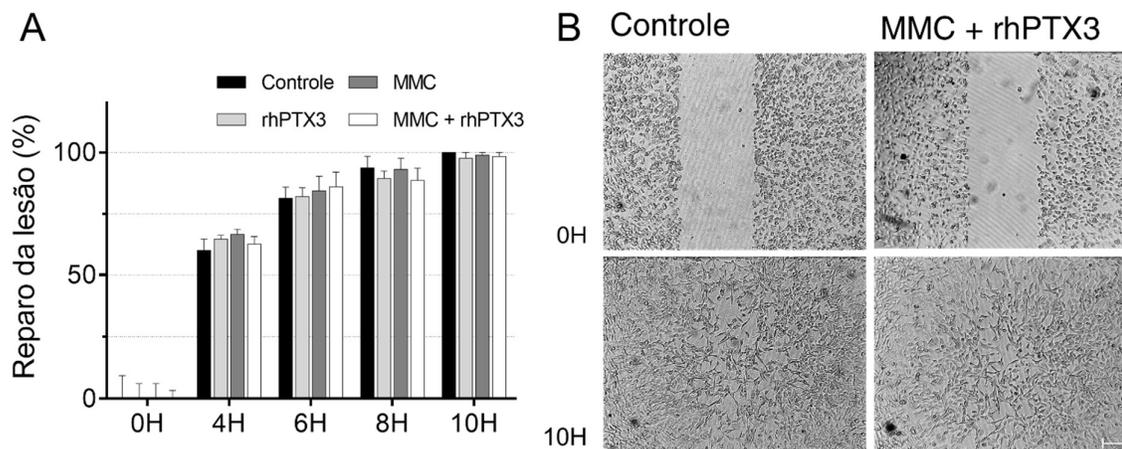


Figura 16. Efeito de rhPTX3 na migração das células de fibrossarcoma HT-1080

As células de fibrossarcoma humano HT-1080 foram cultivadas em placas de 1,8 cm² até que atingissem 100% de confluência e foi feita uma lesão de aproximadamente 2 mm de comprimento na monocamada celular utilizando uma ponteira de 200 µl estéril e a monocamada celular foi lavada com PBS 1X estéril pré-aquecido a 37 °C para remoção das células soltas. As células foram então tratadas com 500 µl de DMEM 10% FBS contendo 1,0 µg/ml de MMC (Mitomicina C) por 16 horas em estufa a 37 °C, 5% CO₂. Em seguida, o meio foi removido e a monocamada celular foi cuidadosamente lavada duas vezes com PBS1X para remoção da MMC. Em seguida, as células foram tratadas com 300 µl de DMEM contendo 5,0 µg/ml de rhPTX3 e o cultivo foi mantido por 10 horas. **(A)** Gráfico representativo do progresso da regeneração da lesão de HT-1080 na presença e ausência de rhPTX3, MMC ou combinação de rhPTX3 e MMC. **(B)** Micrografia representativa da cultura de HT-1080 mostra a área da lesão após nos tempos 0 e 10 horas. Valor p foi calculado usando ANOVA 2 way com pós-teste de Sidak, onde * p < 0,05 e \$ p < 0,001. N = 2 experimentos independentes. Barra de escala: 250 µm.

5.5. Análise da ação de rhPTX3 sobre o crescimento independente de ancoragem nas colônias de células de melanoma humano

Com base nos resultados obtidos nos ensaios de proliferação e migração celular, resolvemos investigar o efeito de rhPTX3 na capacidade das células SK-Mel-37 FGF2^{MID}/PTX3^{MID} e SK-Mel-188 FGF2^{LOW}/PTX3^{LOW} formarem colônias sem ancoragem a um substrato (*soft-agar assay*). Essas células foram cultivadas em suspensão em meio contendo 0,3% (SK-Mel-37) e 0,25% (SK-Mel-188) de agarose e rhPTX3 (5 µg/ml) por cima de uma base previamente solidificada de ágar 0,5%. O meio de tratamento (DMEM + 10% FBS, 2 mM L-glutamina, 1% antibióticos penicilina e estreptomicina e 5 µg/ml de rhPTX3) foi repostado duas vezes por semana,

durante três semanas, sobre a camada de agarose contendo as células em suspensão.

Nossos resultados apontam que o tratamento com rhPTX3 reduziu significativamente o tamanho das colônias provenientes de células únicas (*single cell suspension*) das células de melanoma SK-Mel-37 (replicata 01: grupo controle \bar{X} 607,7 \pm 60 S.E.M e grupo tratado 255,3 \pm 12 μm^2 ; replicata 02: controle 39,4 \pm 2,53, tratado 22,68 \pm 1,75 μm^2 ; replicata 03: controle 32,84 \pm 2,13, tratado 25,08 \pm 1,7 μm^2) e das SK-Mel-188 (replicata 01: controle 57,62 \pm 2,03, tratado: 49,95 \pm 3,46 μm^2 ; replicata 02: 65,87 \pm 4,12, tratado: 35,06 \pm 3,65 μm^2 ; replicata 03: controle 61,62 \pm 5,04, tratado: 25,85 \pm 3,23 μm^2) após as três semanas de crescimento sem ancoragem (Figura 17). Os valores estão sendo representados como a média das 45 colônias \pm S.E.M - erro padrão da média.

Considerando as médias das replicatas, calculamos uma redução de tamanho de área das colônias de 44,57% para SK-Mel-37 e de 51,53% para SK-Mel-188 do grupo tratado com rhPTX3 em relação ao grupo controle. Nas micrografias da Figura 17 é possível observar o aspecto morfológico das colônias de SK-Mel-37 e SK-Mel-188 tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com a proteína rhPTX3.

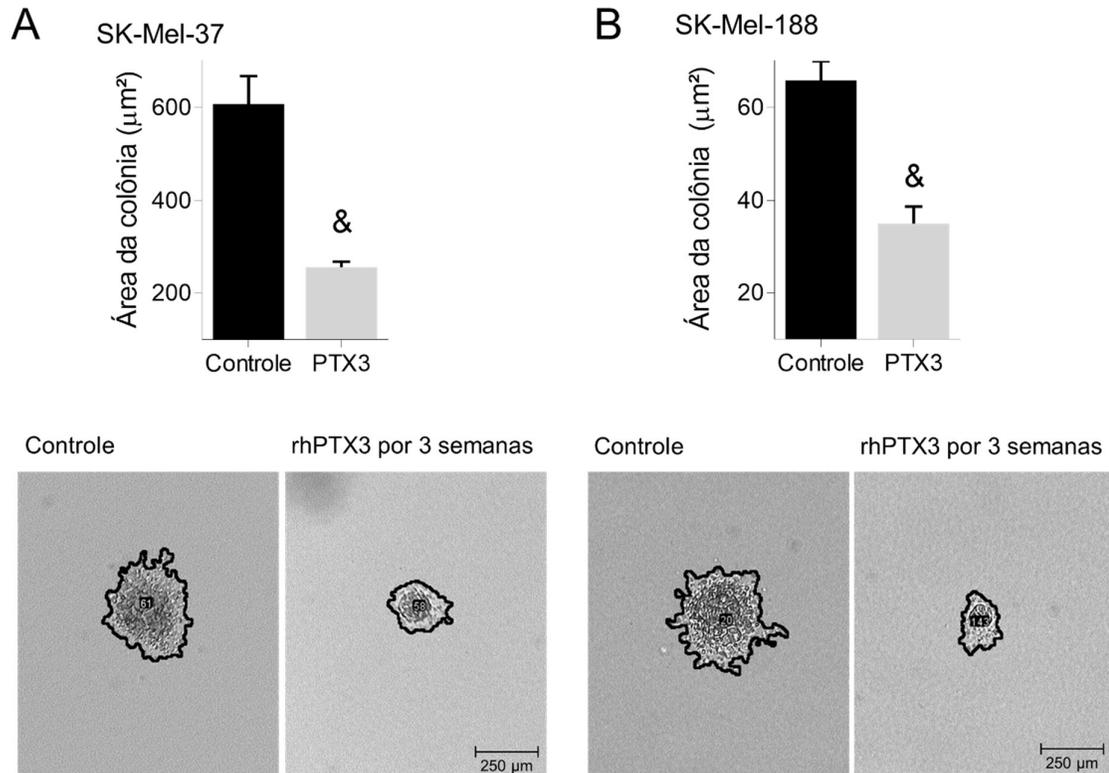


Figura 17. Efeito da proteína rhPTX3 no crescimento independente de ancoragem de colônias das células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188

As células de melanoma SK-Mel-37 $FGF2^{MID}/PTX3^{MID}$ e SK-Mel-188 $FGF2^{LOW}/PTX3^{LOW}$ foram cultivadas por cima de uma camada de DMEM contendo 0,5% de agar, em meio DMEM contendo 10% FBS, 0,3% (SK-Mel-37) ou 0,25% (SK-Mel-188) de agarose e 5,0 μg/ml de rhPTX3. Duas vezes por semana, 200 μl de DMEM contendo 5,0 μg/ml de rhPTX3 era adicionado por cima da camada de agarose para hidratação e reposição de nutrientes. Após três semanas, as colônias foram fotografadas nos grupos controle (n=45) e tratado (n=45) em microscopia ótica de contraste de fase na magnificação de 100x. Gráficos e micrografias representativos das áreas das colônias formadas pelas linhagens SK-Mel-37 (A) e Sk-Mel-188 (B) na presença de rhPTX3. O grupo controle foi composto por células cultivadas sob as mesmas condições e não tratadas com rhPTX3. Valor de p foi calculado usando teste t de *Student* não pareado (média ± erro padrão), onde & p < 0,001. N = 3 experimentos independentes. Barra de escala: 250 μm

5.6. Análise da expressão gênica (mRNA)

5.6.1. Desenho dos iniciadores

Para o início do desenho dos iniciadores, as sequências dos transcritos (mRNAs) foram analisadas utilizando o programa BLASTn. Foi observado que, dos nove genes alvos, cinco codificavam para diferentes isoformas. A fim de construir um iniciador que se anelasse ao cDNA de todas as isoformas, foi selecionada a região de maior similaridade entre as isoformas. Vários critérios foram utilizados para a construção dos iniciadores incluindo anelamento em junção de éxon (quando possível), formação de estruturas secundárias, conteúdo GC e temperatura de *melting* (T_M). O resumo geral dos iniciadores está descrito na Tabela 7.

As imagens no APÊNDICE 3 exemplificam estruturas secundárias em forma de alça (*hairpin*) possíveis de serem obtidas através do pareamento entre nucleotídeos presentes numa mesma sequência. Para todos os genes, foram desenhados iniciadores cujos valores de ΔG obtidos estavam na faixa de 0 e -9 kcal/mole. Esses grampos nos iniciadores *forward* e *reverse*, são possíveis de serem feitas a temperaturas específicas (T_M 48 °C e 34 °C para PTX3 e 39,8 °C e 21 °C para FGF2, respectivamente) diferente das temperaturas obtidas para o anelamento dos mesmos na sequência do molde de cDNA de PTX3 (T_M 54,9 e 55 °C) e FGF2 (T_M 56,8 e 56,1 °C).

A padronização da eficiência de amplificação dos iniciadores para os transcritos dos genes alvo PTX3, FGF2, FGFR1, 2 e 4, FGFBP, VEGFA, IL1B, TNFA foi feita com base na inclinação da curva (*slope*) de diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:1000) de cDNA de células cuja expressão era sabidamente positiva para o gene alvo. Nos nossos ensaios, foram utilizadas as concentrações ($\mu\text{mol}/\mu\text{l}$) dos iniciadores que apresentavam valores de inclinação variando de -3,1 a -3,6 (110-90% de eficiência, respectivamente). Um segundo critério foi a análise da curva de dissociação, onde foram selecionadas as condições que favoreciam a formação de um único pico de amplificação. A Tabela 8 resume as condições otimizadas dos iniciadores empregados nesse trabalho. O APÊNDICE 2 mostra as curvas otimizadas para o gene de PTX3 e cujos critérios elencados no tópico 4.9.4 foram adotados para otimização de todos os outros iniciadores.

Tabela 7. Lista dos iniciadores desenhados para RT-PCR em tempo real.

Alvo Número NCBI	Sequência 5' – 3'		NT	Amplicon (bp)	T _M °C	%GC	Localização nos éxons	Especificidade para isoformas
PTX3 NM_002852.3	FW:	CGG CAG GTT GTG AAA CAG	18	100	54,3	55,6	2-3	Único
	Rv:	GGC ACT AAA AGA CTC AAG CC	20		53,7	50	3	
FGF2 NM_002006.4	FW:	AGA GCG ACC CTC ACA TCA AG	20	78	56,8	55	1-2	Único
	Rv:	CGG TTA GCA CAC ACT CCT TTG	21		56,1	52,4	2	
FGFR1 NM_023110.2	FW:	GGA CGC AAC AGA GAA AGA CT	20	124	54,8	50	12	1-4, 10-14
	Rv:	TGA CAT ACA AGG GAC CAT CCT	21		55,4	47,6	12-13	
FGFR2 NM_000141.4	FW:	GAG TGA TGT CTG GTC CTT CG	20	116	54,9	55	15-16	1-9, 11
	Rv:	ATT CTG TGT CCT TCC TTC AGC	21		54,8	47,6	16	
FGFR4 NM_002011.4	FW:	GCT CAA AGA CAA CGC CTC T	19	108	55,4	52,6	11-12	1, 2, 3 e 4
	Rv:	GCA GAC ACC AAG CAG GTT	18		55,7	55,6	12	
FGFBP NM_198897.1	FW:	AGA CTC ACA GAT GGA TGA CA	20	120	52,8	45	5-6	1 e 2
	Rv:	GCA CAC CAG GCT CTT G	16		53,7	62,5	6-7	
VEGFA NM_001171623.1	FW:	TGC CCA CTG AGG AGT C	16	125	53,8	62,5	3	1-7, 9, 10
	Rv:	CTC TAT CTT TCT TTG GTC TGC	21		50,7	42,9	4-5	
TNFA NM_000594.3	FW:	CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT	21	86	57,8	52,4	3	Único
	Rv:	TTG GCC AGG AGG GCA TT	17		57,3	58,8	4	
IL1B NM_000576.2	FW:	TCC TGC GTG TTG AAA GAT GAT AA	23	66	54,5	39,1	6	Único
	Rv:	TTG GGT AAT TTT TGG GAT CTA CAC T	25		54,4	36	6-7	
IL8 NM_000584.3	FW:	GCA GAG GGT TGT GGA GAA GTT T	22	71	57,4	50	3	Único
	Rv:	TTG GAT ACC ACA GAG AAT GAA TTT TTY	27		53,8	31,5	4	
ACTB NM_001101.3	FW:	GGC ACC CAG CAC AAT GAA	18	65	56,2	55,6	5	Único
	Rv:	CCG ATC CAC ACG GAG TAC TTG	21		57,4	57,1	6	
HPRT1 NM_000194.2	FW:	CCC ACG AAG TGT TGG ATA TAA GC	23	73	55,7	47,8	7	Único
	Rv:	GGG CAT ATC CTA CAA CAA ACT TGT C	25		56	44	8	
GAPDH NM_002046.5	FW:	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA	20	100	58,2	55	8	1, 2, 3 e 4
	Rv:	CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG T	22		56	45,5	9	

NT = quantidade de nucleotídeos; bp = pares de bases; T_M = temperatura de *melting* em graus Célsius (°C); %GC – porcentagem do conteúdo Guanina Citosina na sequência do iniciador. Isoformas – possibilidade de o par de iniciador amplificar as diferentes isoformas de um transcrito.

Tabela 8. Condições otimizadas dos iniciadores para RT-PCR em tempo real

Gene	Célula controle positivo	pmol/ μ l	<i>Threshold</i>	<i>Slope</i>	Eficiência (Equação 1)
PTX3	HT-1080	20	0,30	-3,331	100%
FGF2	HT-1080	15	0,15	-3,236	104%
FGFR1	HT-1080	10	0,20	-3,382	98%
FGFR2	HCT-116	10	0,30	-3,411	96%
FGFR4	HCT-116	5	0,15	-3,563	91%
FGFBP	HT-1080	15	0,30	-3,322	100%
VEGFA	HT-1080	10	0,30	-3,241	103%
TNFA	HUVEC LPS+	15	0,25	-3,142	108%
IL1B	HT-1080	5	0,10	-3,445	95%
IL8	HT-1080	15	0,20	-3,210	105%
ACTB	HT-1080	10	0,40	-3,230	104%
HPRT1	HT-1080	5	0,24	-3,550	91%
GAPDH	HT-1080	10	0,26	-3,495	93%

HUVEC LPS+: célula de endotelial de veia umbilical humana tratada com LPS

5.6.2. Análise da expressão gênica

Para a análise da expressão gênica em resposta ao tratamento com a proteína PTX3 recombinante humana, o RNA total foi extraído das culturas celulares com uma confluência da monocamada de 70 a 90%, conforme descrito na página 57. A quantificação do RNA total extraído foi feita a partir de 1 μ l de RNA total diluído 1:10 ou 1:20 em água ultra-pura tratada com 0,1% DEPC através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm no equipamento Nanodrop. As quantidades de RNA obtidas são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9. Aspectos quantitativos e qualitativos do RNA total extraído das células tratadas com rhPTX3.

Amostra	Concentração de RNA total ng/ μ l	Razão 260/280 nm	Razão 260/230 nm
HT-1080 C1 3H	2194	2,12	1,02
HT-1080 C2 3H	2050	2,10	0,43
HT-1080 C3 3H	1375	2,08	1,67
HT-1080 T1 3H	2097	2,13	1,14
HT-1080 T2 3H	2421	2,11	1,41
HT-1080 T3 3H	2325	2,11	0,82
HCT-116 C1 3H	863	2,09	1,62
HCT-116 C2 3H	858	2,09	1,83
HCT-116 C3 3H	892	2,05	1,47
HCT-116 T1 3H	681	2,10	1,93
HCT-116 T2 3H	651	2,07	1,52
HCT-116 T3 3H	798	2,06	1,19
SK-Mel-37 C1 3H	1417	2,12	1,85
SK-Mel-37 C2 3H	1617	2,12	1,58
SK-Mel-37 C3 3H	1814	2,09	2,07
SK-Mel-37 T1 3H	1613	2,11	1,56
SK-Mel-37 T2 3H	1525	2,11	1,69
SK-Mel-37 T3 3H	1759	2,10	2,13
SK-Mel-188 C1 3H	439	2,07	2,06
SK-Mel-188 C2 3H	730	1,97	2,07
SK-Mel-188 C3 3H	720	1,97	2,12
SK-Mel-188 T1 3H	444	2,06	2,05
SK-Mel-188 T2 3H	566	1,99	2,11
SK-Mel-188 T3 3H	48	2,06	1,22
SK-Mel-37 C1 24H	753	2,01	2,29
SK-Mel-37 C2 24H	156	2,00	2,22
SK-Mel-37 C3 24H	244	2,02	2,25
SK-Mel-37 T1 24H	398	2,04	2,26
SK-Mel-37 T2 24H	364	2,04	2,24
SK-Mel-37 T3 24H	530	2,04	2,25
SK-Mel-188 C1 24H	210	2,02	1,80
SK-Mel-188 C2 24H	228	1,95	1,15
SK-Mel-188 C3 24H	388	2,03	2,10
SK-Mel-188 T1 24H	311	2,03	2,01
SK-Mel-188 T2 24H	468	1,97	2,12
SK-Mel-188 T3 24H	227	1,96	1,20

C1, C2 e C3: não tratado com rhPTX3; T1, T2 e T3: tratado com rhPTX3

A estimativa da contaminação do RNA total por proteínas foi feita a partir da razão entre a leitura a 260 e 280nm (comprimento de onda onde ocorre absorção da luz pelas proteínas) e a contaminação por sais inibidores foi estimada pela razão 260 e 230 nm (comprimento de onda onde ocorre absorção da luz por sais

presentes na amostra). Como pode ser observado pelos dados da Tabela 9, as amostras apresentaram, no geral, valores adequados tanto para contaminação por proteínas quanto por sais, uma vez que os valores considerados aceitáveis para a razão 260/280 e 260/230 são respectivamente 1,8 e 1,8-2,2. Os RNA totais extraídos das linhagens também foram submetidos a análise de integridade. Para isso, 400 ng de cada amostra foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1% em TAE 1X. A Figura 18 mostra o resultado do fracionamento eletroforético em gel de agarose dos RNAs totais extraídos de HT-1080, HCT-116, SK-Mel-37 e SK-Mel-188 tratadas (T1-T3) ou não (C1-C3) com a proteína rhPTX3 (10 µg/ml) por 3 horas.

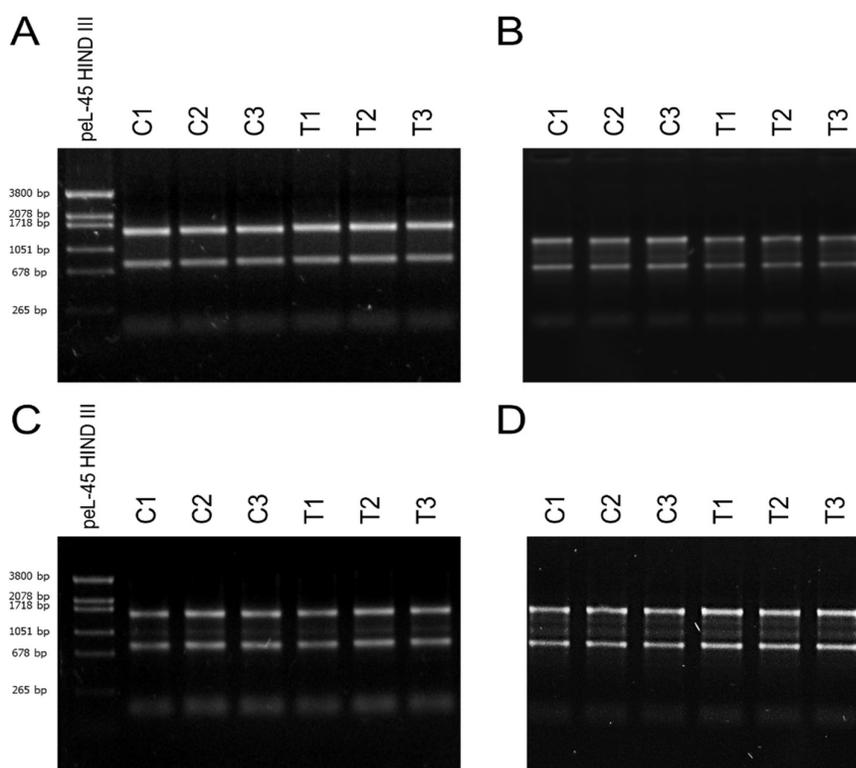


Figura 18. Análise da integridade do RNA total extraído das células tratadas com rhPTX3.

Géis representativos do fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1X corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídeo de 400 ng de RNA total extraído das células tratadas com 10 µg/ml da proteína rhPTX3 por 3 horas. **Canaleta 1:** marcador de tamanho molecular plasmídeo peL-45 digerido com a enzima HIND III; **C1, C2 e C3:** grupos controle. **T1, T2 e T3:** grupo tratado com a proteína rhPTX3. RNA total das linhagens **A)** adenocarcinoma colorretal HCT-116 **B)** fibrossarcoma HT 1080 **C)** melanoma SK-Mel-37 e **D)** melanoma SK-Mel-188.

É possível observar na Figura 19, que a transcrição reversa das amostras de RNA total provenientes das linhagens HT-1080, HCT-116, SK-Mel-37 e SK-Mel-188 foi de boa qualidade, não havendo presença de inibidores nas amostras e com presença de transcritos de tamanho suficiente para permitir a amplificação do gene de expressão constitutiva NOTCH2 por PCR, que gerou uma banda de 310 bp uniforme entre as amostras.

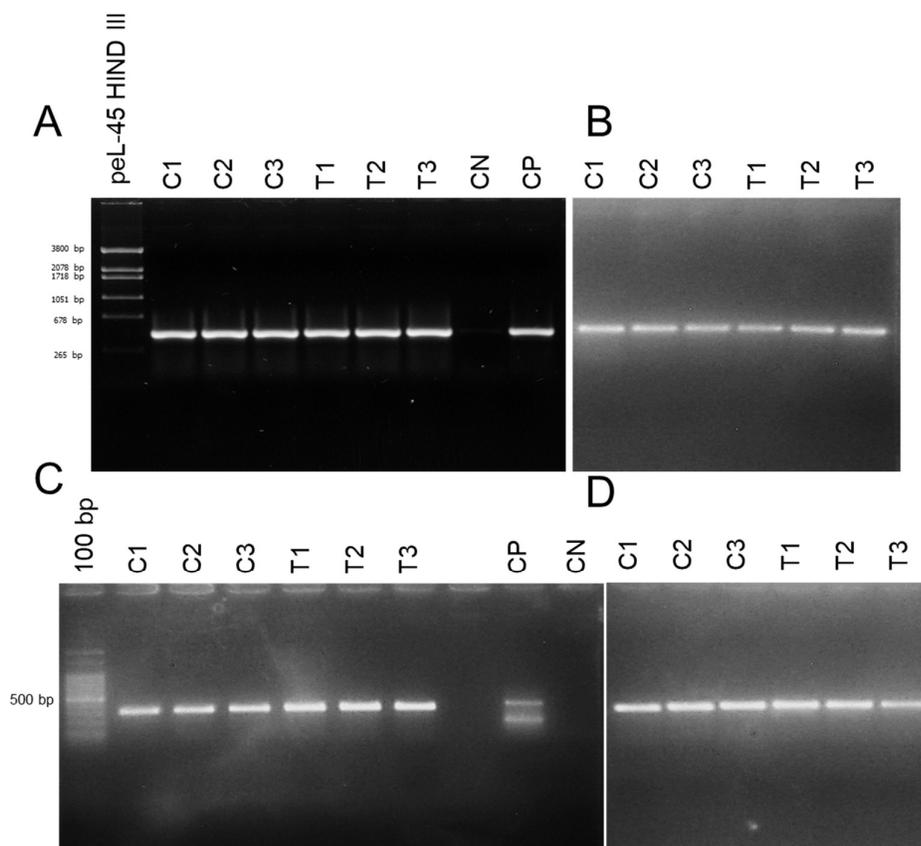


Figura 19. Avaliação da qualidade da transcrição reversa utilizando iniciadores para NOTCH2.

Dois microgramas do RNA total das culturas celulares tratadas ou não com rhPTX3 foram reversamente transcritos utilizando iniciadores oligo(dT)₂₀ e o kit ImProm II (Promega). Os cDNAs sintetizados (1 µl da reação) foram utilizados como molde em PCR utilizando iniciadores específicos para o gene NOTCH2 e gerando um amplicon de 310 bp. Os produtos amplificados foram fracionados eletroforicamente em gel de agarose 1,2% em TAE 1X corado com brometo de etídeo. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular peL-45 HIND III (A) e ladder 100 bp (Invitrogen) (C); demais canaletas: produto amplificado das amostras de cDNA (1 µl) das linhagens (A) HT-1080; (B) HCT-116; (C) SK-Mel-37 e (D) SK-Mel-188; C1, C2 e C3: grupos controle. T1, T2 e T3: grupo tratado com a proteína rhPTX3. CN: controle negativo (sem DNA). CP: controle positivo. Para os produtos da PCR, foram adicionados 1 µl de tampão de corrida de DNA 6X em 6 µl de amostra.

Em seguida, o cDNA das células HT-1080, HCT-116, SK-Mel-37 e SK-Mel-188 do grupo controle (n=3) e tratado com rhPTX3 (n=3) foi diluído em 1:10 e a reação de PCR em tempo real foi efetuada em triplicata técnica para cada cDNA. Os índices de fluorescência dos genes alvo foram normalizados quanto seus níveis de amplificação utilizando os três genes calibradores de expressão constitutiva, GAPDH, HPRT1 e ACTB utilizando a Equação 2. Foram feitas mais duas reações de PCR em tempo real (replicatas 02 e 03) para a linhagem de melanoma SK-Mel-37 utilizando apenas o GAPDH como normalizador de expressão constitutiva. Nesse caso foi utilizada a fórmula de MW Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Nossos dados mostram que a linhagem HT-1080 tem expressão diminuída ($p < 0,001$) do transcrito de PTX3 no grupo tratado ($0,87 \pm 0,02$; *fold change* -1,14x) em comparação ao grupo controle ($1,0 \pm 0,01$). O mesmo efeito foi observado para o gene do principal fator pró-angiogênico VEGFA (controle $1,0 \pm 0,02$; tratado $0,80 \pm 0,02$; *fold change* -1,25x; $p < 0,001$). Em nenhum dos outros genes foi observado efeito modulatório em resposta ao tratamento com a proteína rhPTX3 (Figura 20).

De forma similar ao observado em HT-1080, a expressão gênica de PTX3 na linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116 foi diminuída no grupo tratado ($0,72 \pm 0,03$; $p < 0,001$) comparado ao grupo controle ($1,01 \pm 0,04$; *fold change* -1,39x). Foi observada uma redução na quantidade de transcritos do gene FGFR4 no grupo tratado em resposta ao tratamento com rhPTX3 (controle $1,0 \pm 0,02$; tratado $0,88 \pm 0,03$; *fold change* -1,13x; $p < 0,05$). O nível de expressão de TNFA também foi diminuído no grupo que recebeu rhPTX3 em comparação com o grupo controle ($1,08 \pm 0,06$; tratado $0,65 \pm 0,15$; *fold change* -1,53x; $p < 0,05$) (Figura 21).

Nas linhagens de melanoma, foram observados efeitos diferentes. Enquanto o tratamento com a proteína rhPTX3 na linhagem SK-Mel-188 não promoveu mudanças significativas em nenhum dos genes em nenhum dos tempos observados (3 e 24 horas; Figura 22), na linhagem de melanoma humano SK-Mel-37, na replicata 01, observamos que os níveis de transcritos de FGF2 aumentaram três horas após o tratamento com rhPTX3 (controle $1,03 \pm 0,13$; tratado $1,46x \pm 0,08$; $p < 0,05$). Nas replicatas 02 e 03, foi observado um efeito contrário dos níveis do mRNA de FGF2, onde os níveis foram significativamente reduzidos na replicata 02:

(controle $1,02 \pm 0,07$; tratado $0,26 \pm 0,03$, *fold change* de -4,44) e na replicata 03 (controle $1,01 \pm 0,05$; tratado $0,51 \pm 0,09$, *fold change* de -1,97). Os níveis de transcritos de FGFR4 e FGFBP que foram regulados positivamente na replicata 01 [FGFR4 (controle $1,0 \pm 0,02$; tratado $1,24x \pm 0,03$; $p < 0,001$); FGFBP (controle $1,02 \pm 0,07$; tratado $1,28x \pm 0,03$; $p < 0,05$)] e 02 (FGFR4 *fold change* de 2,9x, $p < 0,0001$; FGFBP 2,47x, $p < 0,0001$), não foram regulados na replicata 03 (Figura 23 e Figura 24).

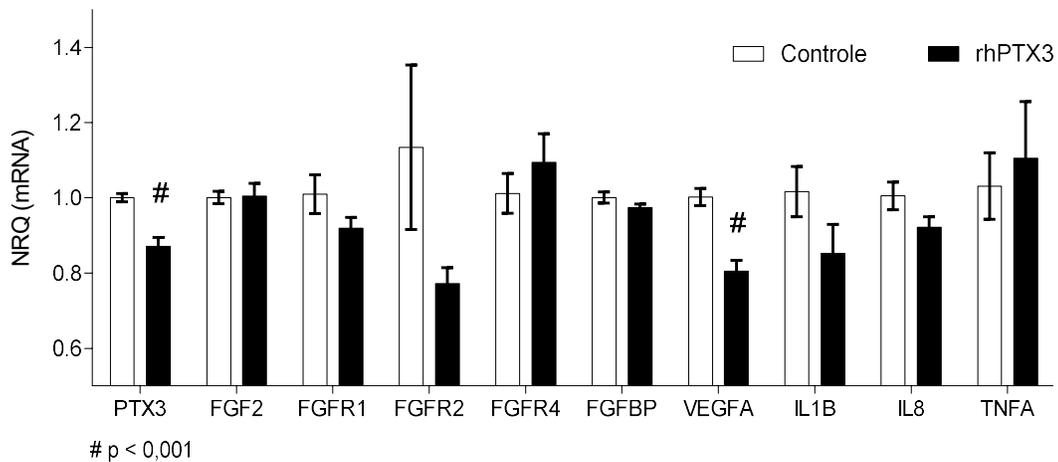


Figura 20. Modulação da expressão gênica por rhPTX3 na linhagem celular HT-1080 de fibrossarcoma

Os níveis de expressão gênica de PTX3, genes pró angiogênicos (VEGFA, FGF2, FGFBP), receptores do tipo tirosina quinase (FGFR1, 2 e 4), citocinas IL1B, IL8 e TNFA foram avaliados por RT-PCR em tempo real pelo método SYBR Green. No grupo tratado (n=3) as células foram mantidas em meio DMEM contendo 10% de FBS e após 24 horas, o meio foi substituído por um contendo 10 µg/ml de rhPTX3 e as células foram incubadas por mais 3 horas. O grupo controle (n=3) não recebeu rhPTX3. Após o RNA total foi extraído pelo método TRIzol e o cDNA foi sintetizado pelo kit ImPromII usando oligo(dT)20 ancorados. A PCR em tempo real foi efetuada em triplicata técnica de um cDNA diluído em 1:10 e a quantificação relativa foi calculada utilizando a equação proposta por Hellemans (Hellemans et al., 2007). Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x. NRQ: quantidade relativa normalizada. Estatística: teste t de Student (média ± erro padrão).

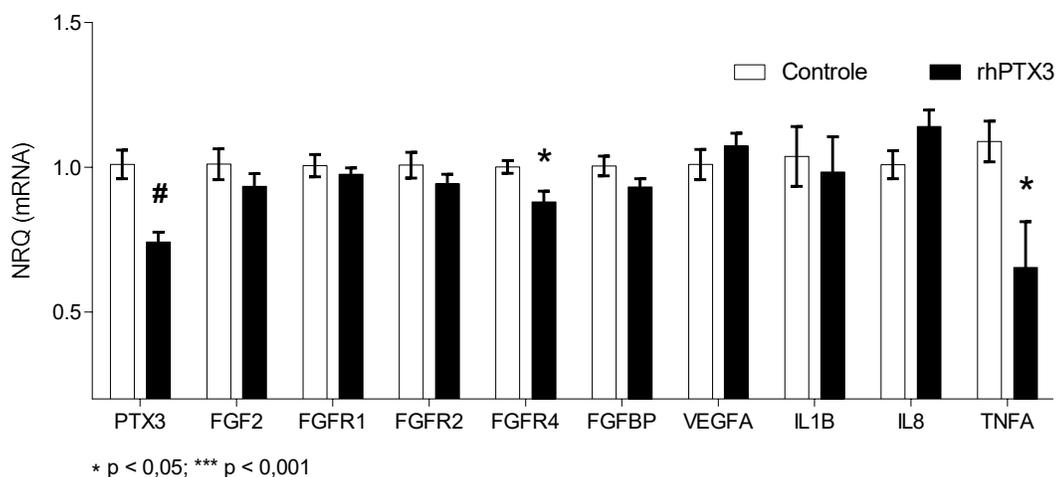


Figura 21. Análise do efeito de rhPTX3 sobre o perfil de expressão gênica nas células HCT-116

Os níveis de expressão gênica de PTX3, genes pró angiogênicos (VEGFA, FGF2, FGF2BP), receptores do tipo tirosina quinase (FGFR1, 2 e 4), citocinas IL1B, IL8 e TNFA foram avaliados por RT-PCR em tempo real utilizando como sistema de detecção o SYBR Green. No grupo tratado (n=3) as células foram mantidas em meio McCoy 5A contendo 10% de FBS e após 24 horas, o meio foi substituído por um contendo 10 µg/ml de rhPTX3 e as células foram incubadas por mais 3 horas. O grupo controle (n=3) não recebeu rhPTX3. Em seguida, o RNA total foi extraído pelo método TRIzol e o cDNA foi sintetizado pelo kit ImPromII usando oligo(dT)20 ancorados. A PCR em tempo real foi efetuada em triplicata técnica de um cDNA diluído em 1:10 e a quantificação relativa foi calculada utilizando a equação proposta por Hellemans (Hellemans et al., 2007). Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x. NRQ: expressão gênica relativa. Estatística: teste t de Student (média ± erro padrão).

Na replicata 01 do tempo de 24 horas com a rhPTX3, o tratamento foi capaz de promover o aumento nos números de transcrito de PTX3, FGF2, IL8 e TNFA em comparação ao grupo não tratado (*fold change* 1,45x p < 0,01; 1,36x p < 0,01; 1,41x p < 0,001 e 1,37x p < 0,01, respectivamente). Nas outras replicatas independentes, os níveis observados de FGF2 foram diminuídos em -1,97x p < 0,01 (replicata 02) e 1,65x p < 0,01 (replicata 03), enquanto os níveis de IL8 e TNFA não foram modulados tanto na replicata 02 quanto na 03 (Figura 24). Com relação à modulação da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNFA, IL1B e IL8, em resposta ao tratamento com rhPTX3 por 3 horas, não foi observado nenhuma modificação nos níveis de transcrito nas linhagens HT-1080, SK-Mel-37, SK-Mel-188 e HCT-116.

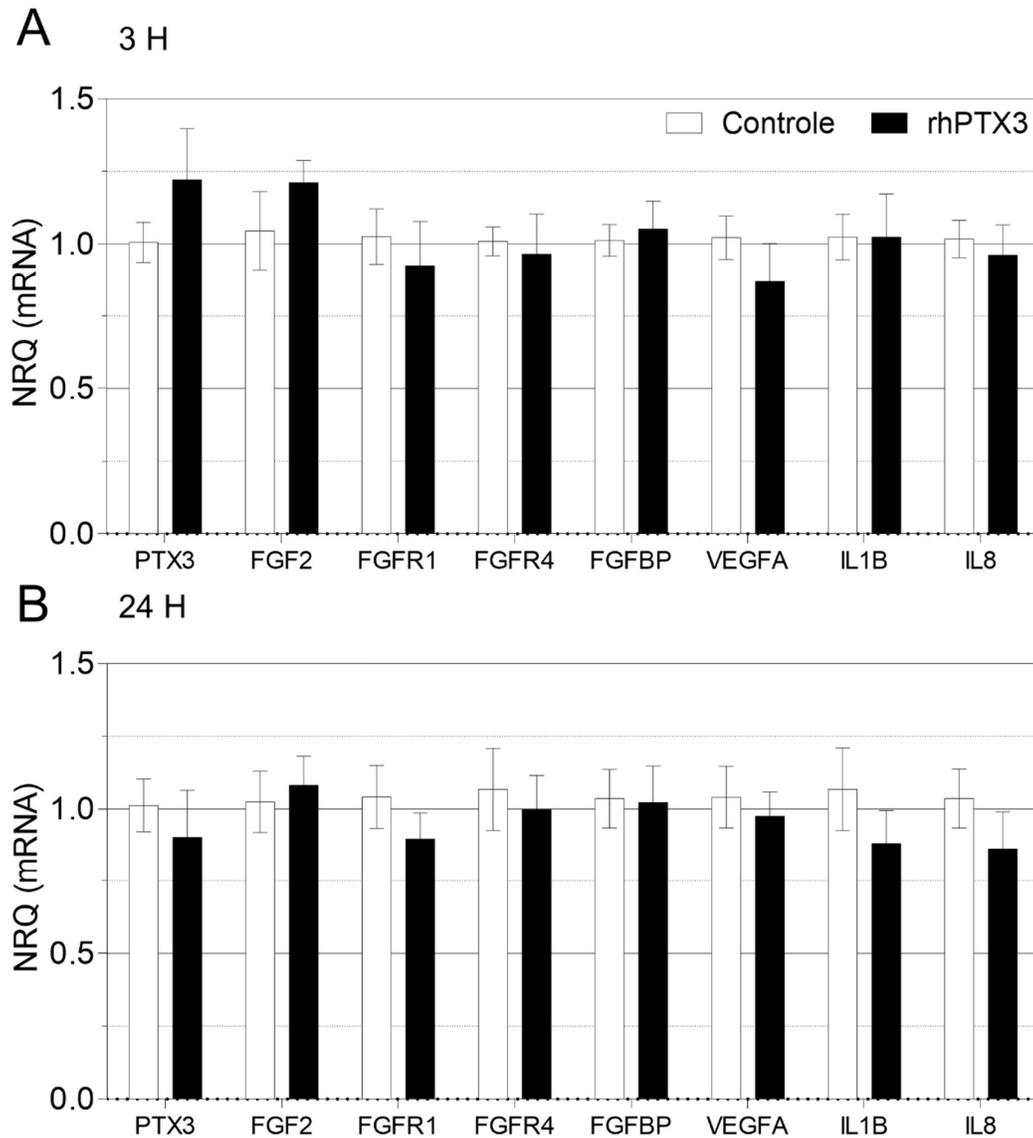


Figura 22. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de SK-Mel-188

Os níveis de expressão gênica de PTX3, dos genes pró angiogênicos (VEGFA, FGF2, FGFBP), dos receptores do tipo tirosina quinase (FGFR1, 2 e 4) e das citocinas IL1B, IL8 e TNFA foram avaliados por RT-PCR em tempo real pelo método SYBR Green. No grupo tratado (n=3) as células foram mantidas em meio DMEM contendo 10% de FBS e após 24 horas, o meio foi substituído por outro contendo 10 µg/ml de rhPTX3 e as células foram incubadas por 3 horas. O grupo controle (n=3) não recebeu rhPTX3. Após o tratamento, o RNA total foi extraído pelo método TRIZOL e o cDNA foi sintetizado pelo kit ImPromII usando oligo(dT)₂₀ ancorados. A PCR em tempo real foi efetuada em triplicata técnica de um cDNA diluído em 1:10 e a quantificação relativa foi calculada utilizando a equação proposta por Hellemans (Hellemans et al., 2007). Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x. NRQ: expressão gênica relativa. Estatística: teste t de Student (média ± erro padrão).

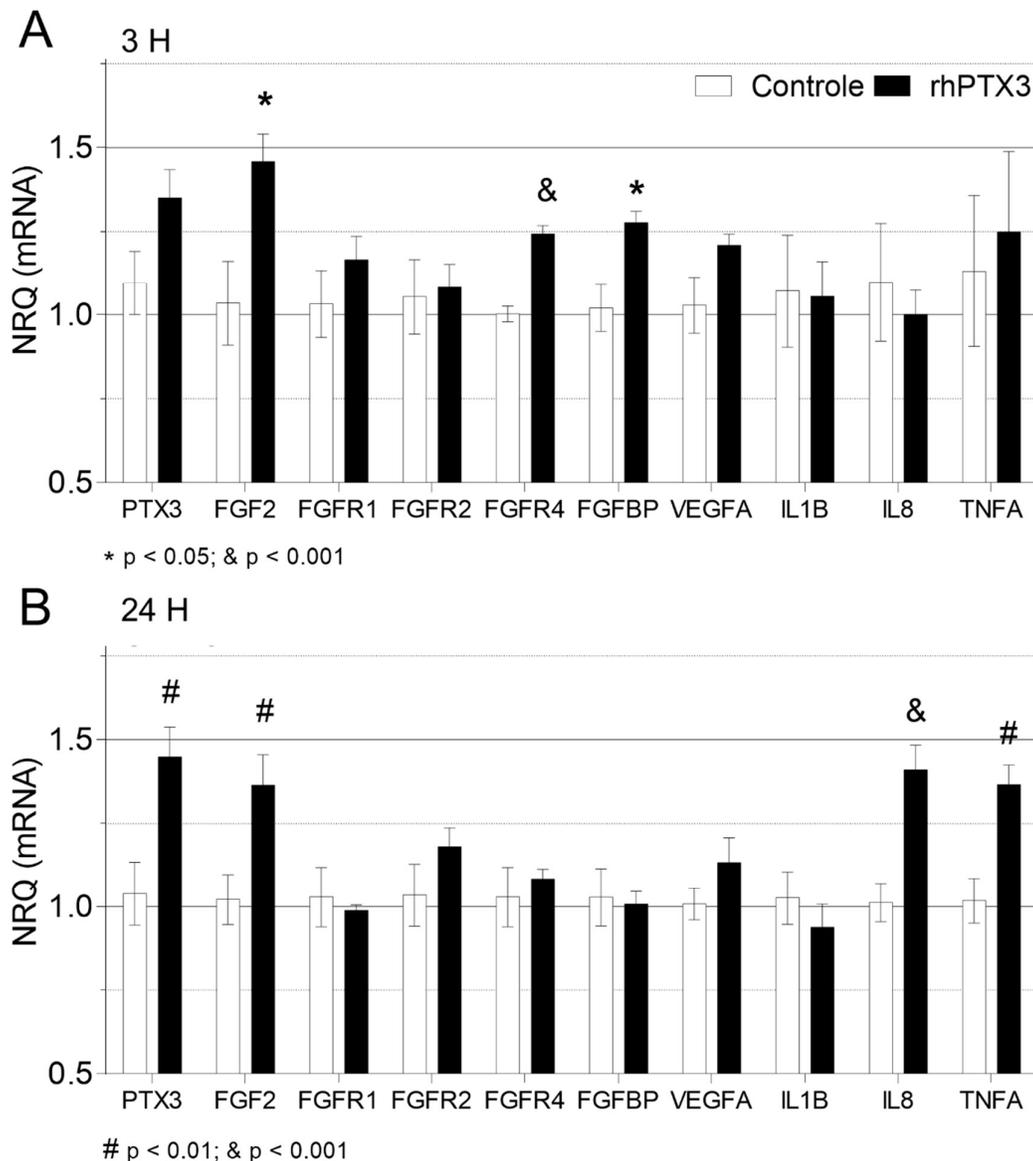


Figura 23. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de SK-Mel-37

Os níveis de expressão gênica de PTX3, genes pró angiogênicos (VEGFA, FGF2, FGFBP), receptores do tipo tirosina quinase (FGFR1, 2 e 4), citocinas IL1B, IL8 e TNFA foram avaliados por RT-PCR em tempo real pelo método SYBR Green. No grupo tratado (n=3) as células foram mantidas em meio DMEM contendo 10% de FBS e após 24 horas, o meio foi substituído por um contendo 10 µg/ml de rhPTX3 e as células foram incubadas por 3 horas (A) e 24 horas (B). O grupo controle (n=3) não recebeu rhPTX3. Após o tratamento, o RNA total foi extraído pelo método TRizol e o cDNA foi sintetizado pelo kit ImPromII usando oligo(dT)₂₀ ancorados. A PCR em tempo real foi efetuada em triplicata técnica de um cDNA diluído em 1:10 e a quantificação relativa foi calculada utilizando a equação proposta por Hellemans (Hellemans et al., 2007). Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x. NRQ: expressão gênica relativa. Estatística: teste t de Student (média ± erro padrão).

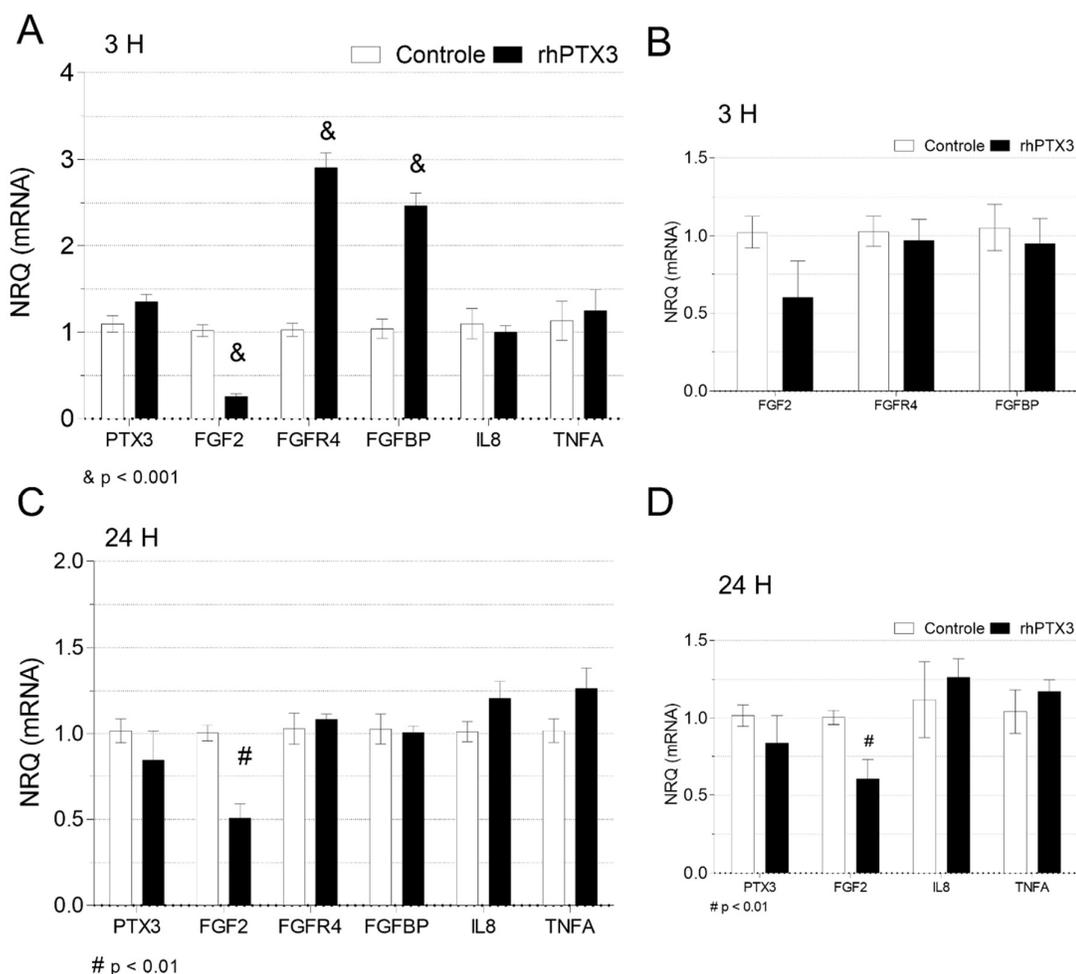


Figura 24. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de SK-Mel-37 (replicata 02 e 03)

Os níveis de expressão gênica dos genes diferencialmente expressos na replicata 01 do tratamento com rhPTX3 foram avaliados por RT-PCR em tempo real pelo método SYBR Green. No grupo tratado (n=3) as células foram mantidas em meio DMEM contendo 10% de FBS e após 24 horas, o meio foi substituído por um contendo 10 µg/ml de rhPTX3 e as células foram incubadas por mais 3 horas (**A e B** – replicata 02 e 03) e 24 horas (**C e D** – replicata 02 e 03). O grupo controle (n=3) não recebeu rhPTX3. Após, o RNA total foi extraído utilizando o *miRVana Isolation Kit* e o cDNA foi sintetizado pelo kit ImPromII usando oligo(dT)₂₀ ancorados. A PCR em tempo real foi efetuada em triplicata técnica de um cDNA diluído em 1:10 e a quantificação relativa foi calculada utilizando a equação proposta por MW Pfaffl (2001). Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x. NRQ: expressão gênica relativa. Estatística: teste t de Student (média ± erro padrão).

5.7. Análise da expressão de miRNA

Para a análise da expressão de miRNAs em resposta ao tratamento com a proteína PTX3 recombinante humana, o RNA total de três replicatas independentes foi extraído das linhagens de melanoma maligno SK-Mel-37 e SK-Mel-188 conforme descrito no tópico 4.10.1 da página 60. A quantificação do RNA total extraído foi feita a partir de 1 µl de RNA total diluído 1:10 ou 1:20 em água ultra-pura tratada com 0,1% DEPC através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm no equipamento Nanodrop. A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese capilar utilizando o equipamento BioAnalyzer conforme Figura 25 e Figura 26.

Todos os RNAs extraídos obtiveram um valor RIN acima de 9,5, indicando RNAs de altíssima qualidade, o que garante seu uso para ensaios de transcrição reversa e PCR em tempo real (índice RIN requerido: > 5) (Figura 25 e Figura 26). Cabe observar que as amostras D4 e D6 apresentam um perfil típico de RNA 28 e 18S e que o valor RIN não foi gerado por provável problemas no Bioanalyzer, deslocando as bandas para posições inadequadas Figura 25. A amostra B5, apesar de não ter gerado número RIN, foi utilizada nos experimentos por possuir perfil de bandas esperadas para RNA íntegros. Já a amostra C2 apresentou um perfil típico de RNA degradado (Figura 25).

Assim, as amostras de SK-Mel-37 (replicata 01: 1-6; replicata 02: C1, C3-C5; replicata 03: D1-D6; 24 horas: replicata 01: 7-12; replicata 02: A1-A6 e replicata 03: B1-B6) e de SK-Mel-188 (replicata 01: 13-18; replicata 02: E2-E6; replicata 03: F1-F6. 24 horas: E2-E6) foram submetidas a transcrição reversa utilizando a enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* com um pool de 14 primers de miRNA e 2 primers dos snoRNA RNU44 e RNU48. Em seguida, o cDNA foi diluído 1:10 e utilizado como molde para reação de PCR em tempo real com sondas TaqMan específicas para cada miRNA no equipamento QuantStudio 12K Flex.

Inicialmente foi feito um *screening* dos miRNA diferencialmente expressos em resposta ao tratamento com a rhPTX3 e esse experimento foi feito utilizando apenas duplicata técnica de cada cDNA alvo das células SK-Mel-188 e SK-Mel-37 tratadas por 3 e 24 horas. Como resultado, observamos que o tratamento com a

proteína rhPTX3 modulou positivamente a expressão dos miRNA miR-188 (*fold change* 2,65x $p < 0,05$) e miR-29b (*fold change* 1,56x $p < 0,05$) apenas no tempo de 3 horas na célula SK-Mel-37 (Figura 27A) e dos miR-149 (tempo 3H, *fold change* -1,74x $p < 0,05$) e miR-21 (tempo 24H, *fold change* 1,26x $p < 0,05$) na célula SK-Mel-188 (Figura 27C e D, respectivamente). Repetimos esse experimento utilizando triplicata técnica dos cDNAs e constatamos que os miRNAs miR-188 (SK-Mel-37) e miR-149 (SK-Mel-188) apresentaram resultados consistentes (*fold change* 1,94x $p < 0,05$ e -1,77x $p < 0,01$, respectivamente). Prosseguimos as análises com apenas esses dois miRNAs e foram feitas reações de PCR em tempo real nas replicatas independentes 02 e 03. Entretanto, não houve modulação da expressão desses microRNAs em resposta ao tratamento com rhPTX3 nestas replicatas (Figura 28).

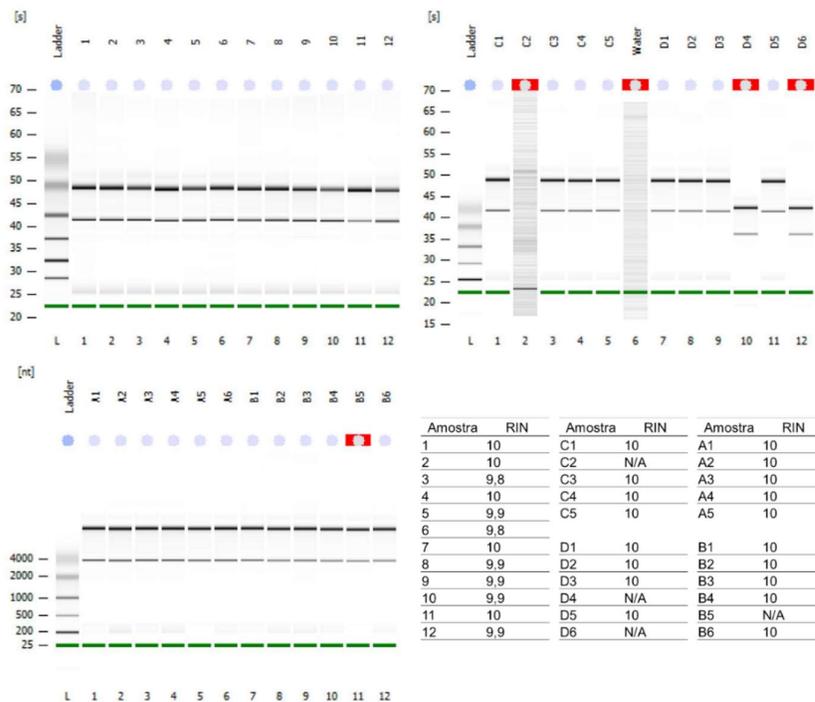


Figura 25. Integridade do RNA total da linhagem de melanoma SK-Mel-37 para análise de miRNA

O RNA total das células de melanoma SK-Mel-37 tratado por 3 ou 24 horas (três replicatas independentes cada) foi extraído utilizando o kit *miRvana miRNA Isolation Kit* e a integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese capilar utilizando o chip RNA Nano no equipamento Bioanalyzer. Géis virtuais gerados a partir de eletroferogramas dos RNAs ribossomais 18 e 28S das amostras de SK-Mel-37: 3 horas: replicata 1: 1-6; replicata 02: C1-C5; replicata 03: D1-D6; 24 horas: replicata 01: 7-12; replicata 02: A1-A6 e replicata 03: B1-B6. A tabela mostra o valor RIN (*RNA Integrity Number*) obtido para cada amostra.



Figura 26. Integridade do RNA total da linhagem de melanoma SK-Mel-188 para análise de miRNA

O RNA total das células de melanoma SK-Mel-188 tratado por 3 (três replicatas independentes) ou 24 horas (uma replicata) foi extraído utilizando o kit *miRvana miRNA Isolation Kit* e a integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese capilar utilizando o chip RNA Nano no equipamento Bioanalyzer. Géis virtuais gerados a partir de eletroferogramas dos RNAs ribossômicos 18 e 28S das amostras de SK-Mel-188: 3 horas: replicata 01: 13-18; replicata 02: E2-E6; replicata 03: F1-F6. 24 horas: 19-24. A tabela mostra o valor RIN (*RNA Integrity Number*) obtido para cada amostra.

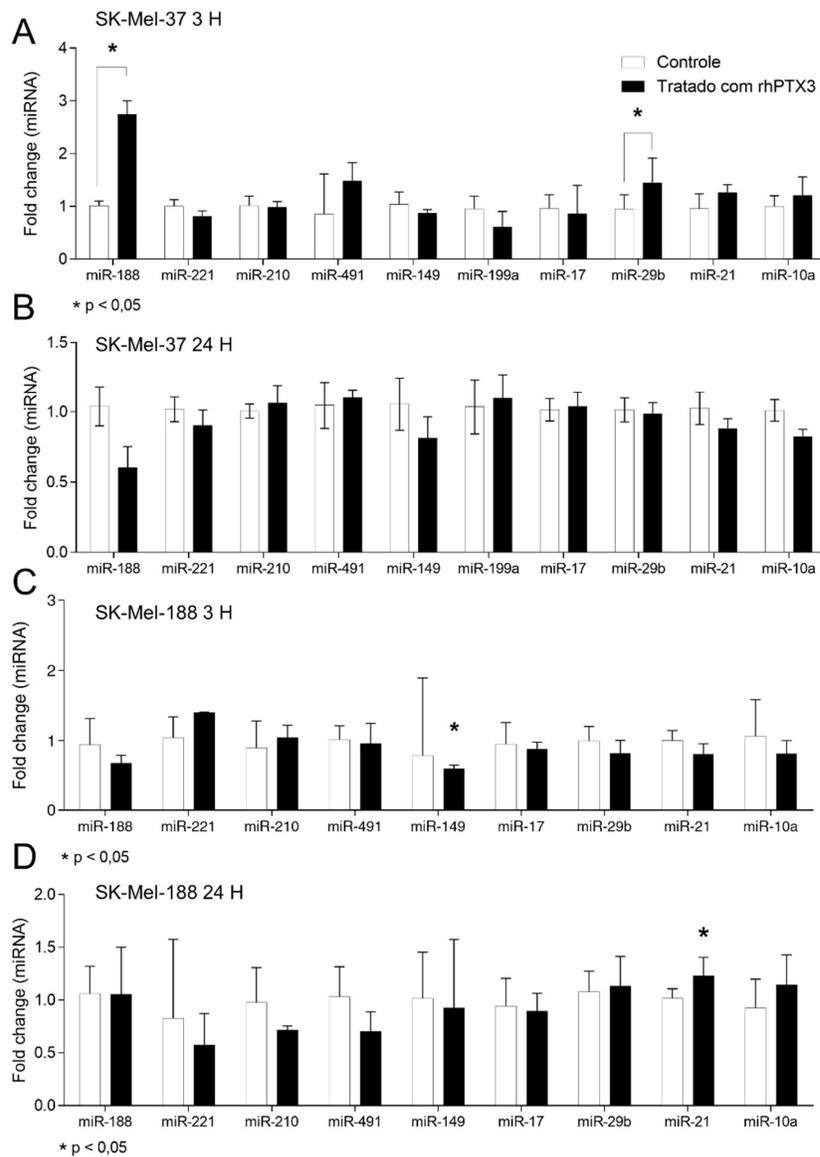


Figura 27. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão de miRNAs nas linhagens de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188

Os níveis de expressão dos miR-188, miR-221, miR-210, miR-149, miR-199a, miR-17, miR-29b, miR-21 e miR-10a foram avaliados por RT-PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan. No grupo tratado (n=3) as células foram mantidas em meio DMEM contendo 10% de FBS e após 24 horas, o meio foi substituído por um contendo 10 µg/ml de rhPTX3 e as células foram incubadas por 3 horas. O grupo controle (n=3) não recebeu rhPTX3. Após o RNA total foi extraído utilizando *miRVana miRNA Isolation Kit* e o cDNA foi sintetizado pelo kit utilizando um pool de iniciadores para todos os miRNA e a enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*. A PCR em tempo real foi efetuada em duplicata técnica de um cDNA diluído em 1:10 e a quantificação relativa foi calculada utilizando a equação de Livak e Schmittgen $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x. Estatística: teste t de *Student* (mediana com intervalo interquartil).

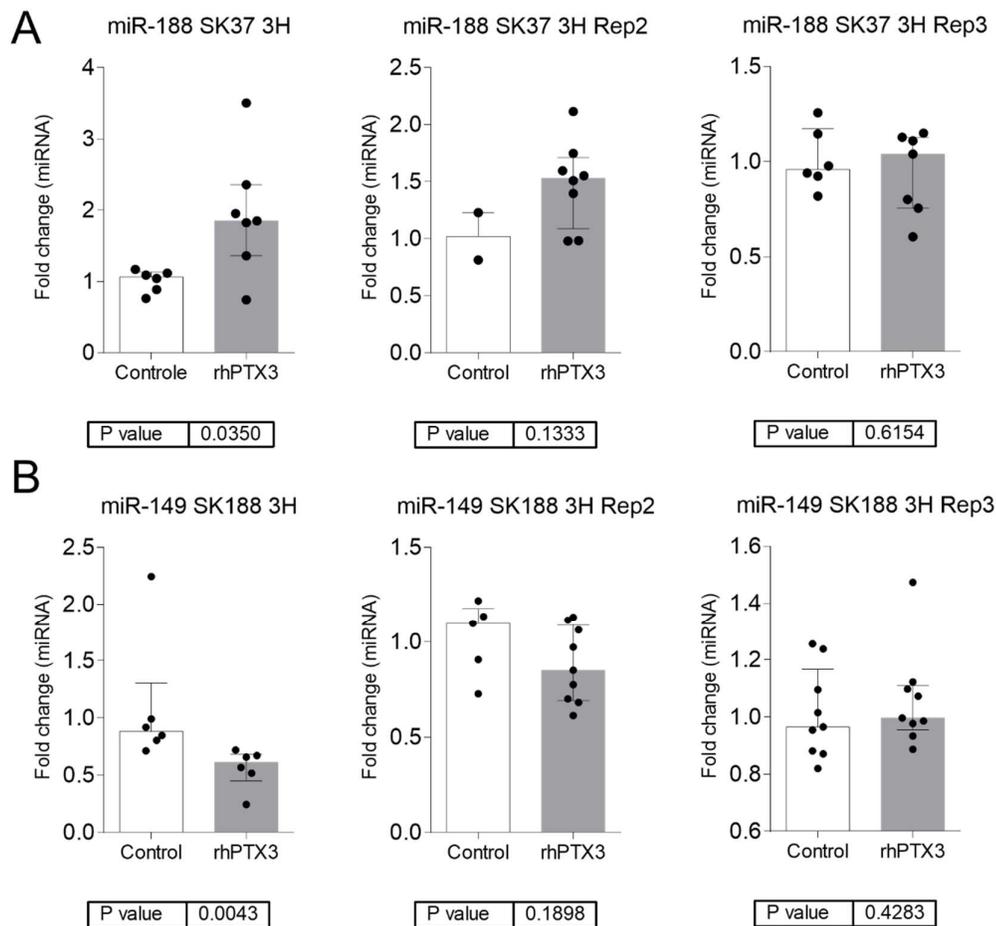


Figura 28. Análise do efeito de rhPTX3 na expressão dos miR-188 e miR-149 nas linhagens de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188

Os níveis de expressão dos miR-188 e miR-149 foram avaliados por RT-PCR em tempo real utilizando sondas TaqMan. No grupo tratado (n=3) as células foram mantidas em meio DMEM contendo 10% de FBS e após 24 horas, o meio foi substituído por um contendo 10 µg/ml de rhPTX3 e as células foram incubadas por mais 3 horas. O grupo controle (n=3) não recebeu rhPTX3. Após o RNA total foi extraído utilizando *miRVana miRNA Isolation Kit* e o cDNA foi sintetizado pelo kit utilizando um pool iniciadores para todos os miRNA e a enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*. A PCR em tempo real foi efetuada em triplicata técnica de um cDNA diluído em 1:10 e a quantificação relativa foi calculada utilizando a equação de Livak e Schmittgen $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x. **A)** SK37: SK-Mel-37; **B)** SK188: SK-Mel-188; Rep: replicata. Estatística: teste t de *Student* (mediana com intervalo interquartil).

5.8. Obtenção de linhagens transfectadas estáveis

Utilizamos duas linhagens de células provenientes de melanoma maligno SK-Mel-37 e SK-Mel-188 para o procedimento de transfecção com o plasmídeo retroviral contendo o cDNA completo de PTX3 humano. Para obtenção de quantidade suficiente dos plasmídeos pBABE_puro e pBABE_PTX3, as bactérias quimiocompetentes *Escherichia coli* TOP10 foram transformadas utilizando o método do choque térmico e plaqueadas em meio LB-agar contendo 100 µg/ml do antibiótico ampicilina. Em presença de ampicilina não houve nenhum crescimento de colônias na placa onde foram semeadas as bactérias TOPO10 não transfectadas; cresceram 10 colônias na placa que recebeu as bactérias transformadas com o plasmídeo pBABE_mock e 4 colônias provenientes das bactérias que receberam o pBABE_PTX3 (Figura 42, APÊNDICE 4). Com o auxílio de uma alça calibrada de coleta (em *loop*), foram coletadas todas as colônias que cresceram nas placas. Amostras do lisado das bactérias de cada um dos clones foram utilizadas como molde em reações de PCR para amplificação do gene de PTX3 humano, conforme descrito no tópico 4.11.2, página 68. Como mostrado na Figura 29, a partir de todos os clones de bactérias que foram transformadas com o plasmídeo pBABE_PTX3 foi amplificada uma banda de 431 bp do tamanho esperado correspondente ao inserto do cDNA de PTX3 humano, enquanto nenhuma amplificação correu a partir dos clones transformados com o pBABE_mock que cresceram em presença de ampicilina. Selecionamos aleatoriamente dois clones (clone 5 de pBABE_mock: 5_mock; clone 4 de pBABE_PTX3: 4_PTX3) para preparação do DNA plasmidial (pDNA) em média escala (mid-prep) conforme descrito no tópico 4.11.3 (página 68).

Obtivemos uma quantidade total de 5,6 µg do pDNA pBABE_mock e 2,58 µg do pBABE_PTX3. Os pDNAs obtidos foram de excelente qualidade atestada pela baixa contaminação tanto por proteínas, quanto por sais (razão 260/280 nm: ~2,2 e razão 260/230 nm: ~2,4, respectivamente) (Tabela 10).

A confirmação das construções na preparação de plasmídeos foi feita por análise de restrição utilizando a enzima EcoRI e, novamente, também por PCR. O vetor pBABE-puro contém apenas um sítio de restrição reconhecido pela enzima ECORI, localizado na região MSC do plasmídeo. Portanto, a digestão do plasmídeo

com essa enzima, lineariza o vetor e, por eletroforese é possível a visualização de apenas uma banda do tamanho do vetor. Foi o que observamos como resultado da digestão do pDNA do clone 5 que foi transfectado com o plasmídeo vazio (pBABE_mock).

Na construção pBABE_PTX3 são encontrados três sítios de restrição para EcoRI nas posições 1362, 2252. O primeiro é resultante do sítio de clonagem do inserto no sítio original para EcoRI presente na região MSC do vetor e o segundo sítio presente na sequência clonada do cDNA de PTX3. Desta forma, observamos, conforme esperado, que a digestão com EcoRI do plasmídeo extraído do clone 4, transformado com pBABE_PTX3, gerou as bandas esperadas com tamanho aproximado de 5000, 900 e 400 e de 5.000 bp correspondente ao vetor vazio pBABE_mock. (Figura 30A).

Com relação à amplificação por PCR utilizando iniciadores para PTX3, houve formação do produto amplificado de tamanho esperado de 471 bp apenas a partir do clone 4_PTX3, conforme esperado, não havendo sinais de amplificação a partir do pDNA extraído do clone 5_mock (Figura 30B).

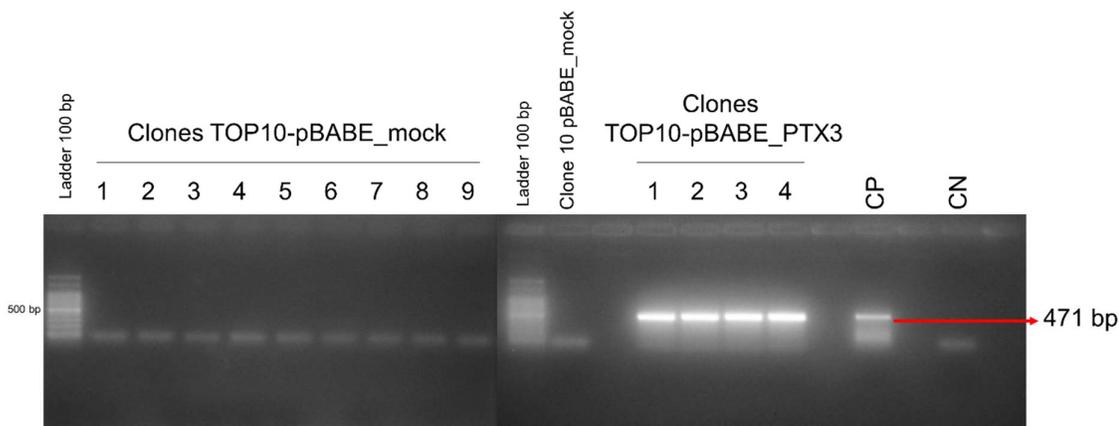


Figura 29. Confirmação, por PCR, dos clones de bactérias transformadas com os plasmídeos pBABE_mock e pBABE_PTX3

As bactérias quimiocompetentes TOP10 foram transformadas pelo método do choque térmico para incorporação do DNA plasmidial pBABE_mock ou com o cDNA completo de PTX3 humano (pBABE_PTX3). As bactérias foram plaqueadas em meio LB-agar contendo ampicilina 100 µg/ml, as colônias que cresceram foram coletadas e cultivadas em meio LB por 16 horas e 2 µl da cultura usados como molde para a reação PCR utilizando iniciadores específicos para PTX3 humano. Os géis acima mostram o produto da PCR (amplicon) fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1,2% corado com 0,5 µg/ml BrEt. O tamanho da banda amplificada dos clones transformados com o plasmídeo pBABE/PTX3 apresentou o tamanho esperado de 437 bp. CP: controle positivo para PTX3 de um cDNA construído a partir do RNA total extraído da linhagem HT-1080; CN: controle negativo da reação (sem DNA); bp: pares de bases.

Tabela 10. Quantificação dos pDNAs extraídos dos clones 4_PTX3 e 5_mock

Amostra	(ng/µl)	260/280 nm	260/230 nm	TOTAL (ng/µl)
Branco	-0,4	0,79	1,19	
pBABE_mock (1:20)	280,1	2,2	2,38	5.602
pBABE_PTX3 (1:20)	129,1	2,19	2,34	2.582

1:20: fator de diluição do pDNA em água ultrapura esterilizada

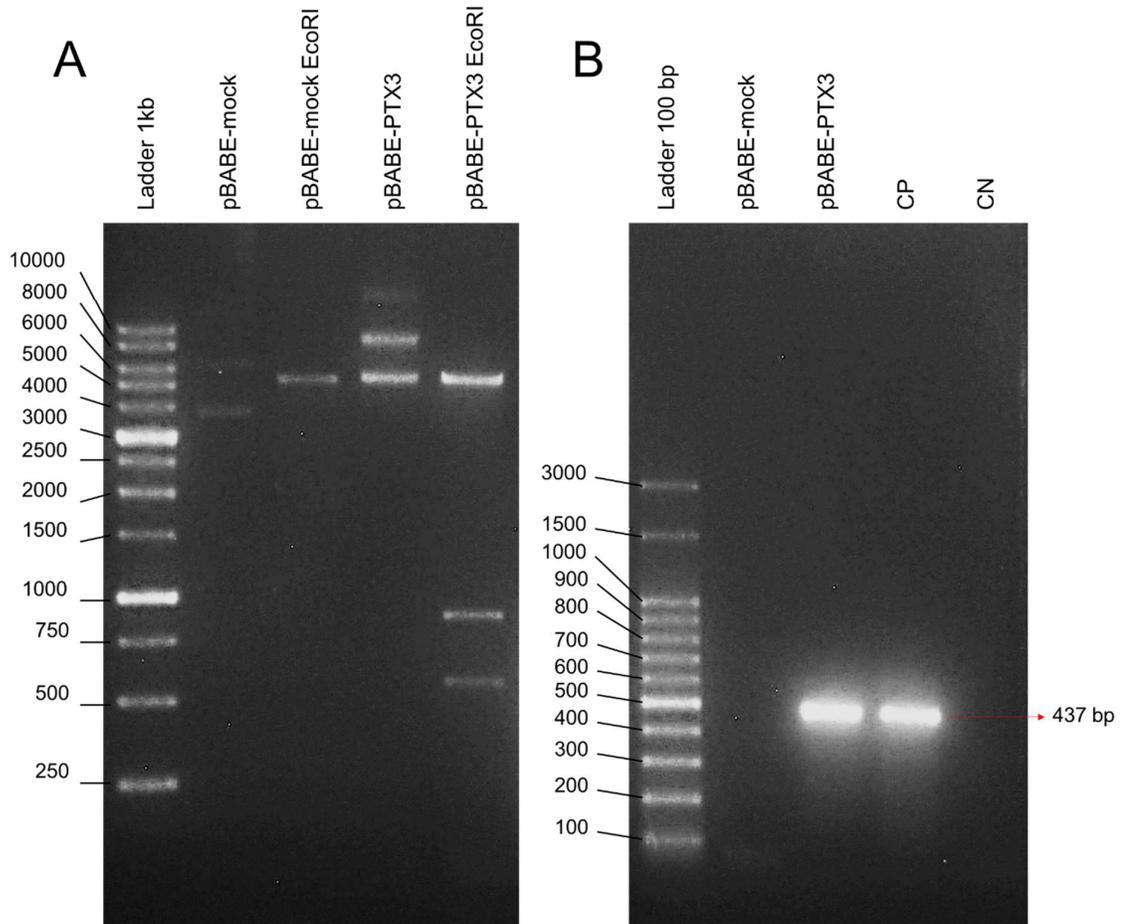


Figura 30. Análise de restrição e por PCR para confirmação dos plasmídeos obtidos por mid-prep a partir dos clones 5_mock e 4_PTX3 das bactérias transformadas

Os pDNAs pBABE_mock (5,6 ug) e pBABE_PTX3 (2,6ug) obtidos por midi-prep foram submetidos a digestão utilizando a endonuclease de restrição EcoRI (5U a 37 °C por 15 min) e o produto da digestão foi fracionado eletroforicamente em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo e fotografado sob luz UV para visualização das bandas (A). Paralelamente, os plasmídeos (10 pg de cada) foram usados como molde em reações de PCR com iniciadores específicos para PTX3. O produto amplificado foi submetido a fracionamento eletroforético em gel de agarose X%, corado com brometo de etídeo e fotografado sob luz UV para visualização das bandas (B). CP: controle positivo para PTX3 de um cDNA construído a partir do RNA total extraído da linhagem HT-1080. CN: controle negativo (sem cDNA). bp: pares de bases. Ladder:1 kb (A); Ladder 100 bp (B) (Invitrogen).

Após a verificação da qualidade dos pDNAs pBABE_mock e pBABE_PTX3, as células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 WT (tipo selvagem, não transfectadas) foram submetidas ao experimento de curva de morte com concentrações variadas de puromicina (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 µg/ml) em meio DMEM com 10% de FBS e 2 mM de L-glutamina por 24, 48 e 72 horas. Como resultado, foi observado que a menor concentração de puromicina que mata 100% das células após 48 horas foi de 1 µg/ml para SK-Mel-37 e 0,5 µg/ml para SK-Mel-188 (APÊNDICE 6). Determinada a concentração de uso da puromicina, as células foram plaqueadas em 01 célula por poço da placa de 96 poços e constatamos que ambas as células das linhagens de melanoma maligno SK-Mel-37 e SK-Mel-188 foram capazes de formar colônias a partir de uma única célula.

Em seguida, as células foram submetidas ao procedimento de transfecção utilizando o kit *Effectene Transfection Reagent* com quantidades de pDNA (mock e PTX3) que variava de 50 a 400 ng e de 2,5 a 7,5 µl de Effectene. Como resultado, identificamos que as condições de reagentes que foram eficientes para a transfecção das células foram: 400 ng de DNA plasmidial e 5 ou 7,5 µl de Effectene. Após 1 mês da transfecção obtivemos culturas estáveis de células de melanoma humano SK-Mel-37 e SK-Mel-188 *wild type* (Figura 31A e D, respectivamente) transfectadas com os plasmídeos pBABE_mock (Figura 31B e E) e pBABE_PTX3 (Figura 31C e F).

Utilizando o método da microscopia óptica de contraste de fase na magnificação de 200X, não foi possível observar modificações na morfologia das células SK-Mel-188 transfectadas com pBABE_mock e pBABE_PTX3 em comparação com as células *wild type* através. Entretanto, quando analisamos a linhagem SK-Mel-37, pudemos constatar que as células transformadas com pBABE_PTX3 apresentaram bolhas de membranas, que estão ausentes nas células *wild type* e pBABE_mock.

Em seguida, o nível de expressão dos transcritos de PTX3 nas células foi avaliado quanto à por RT-PCR em tempo real, bem como as taxas de proliferação celular pelo método do MTT.

A extração do RNA total e a transcrição reversa das células transfectadas foram realizadas conforme descrito nos itens 4.9.2 e 4.9.3, respectivamente. A reação de PCR em tempo real foi feita utilizando iniciadores específicos para PCR e a metodologia está descrita no tópico 4.9.4. Os resultados mostram que a transfecção das células SK-Mel-37 com o vetor vazio não alterou o padrão de expressão de PTX3 (Figura 32A). Entretanto, nas células SK-Mel-37 transfectadas com o plasmídeo pBABE_PTX3 ocorreu um aumento estatisticamente significativo de aproximadamente 50 vezes ($p < 0,0001$) dos níveis de transcritos de PTX3 da ordem de 51) em relação ao grupo WT. Na linhagem SK-Mel-188, a transfecção com pBABE_PTX3 aumentou os níveis de transcrito em 88,5 vezes em relação ao grupo WT ($p < 0,001$) e 274,3 em comparação com o grupo pBABE_mock ($p = 0,0003$) (Figura 32B). É possível observar que as células transfectadas com pBABE_mock expressam menos PTX3 que as células WT ($-3,1x p < 0,05$) (Figura 32B).

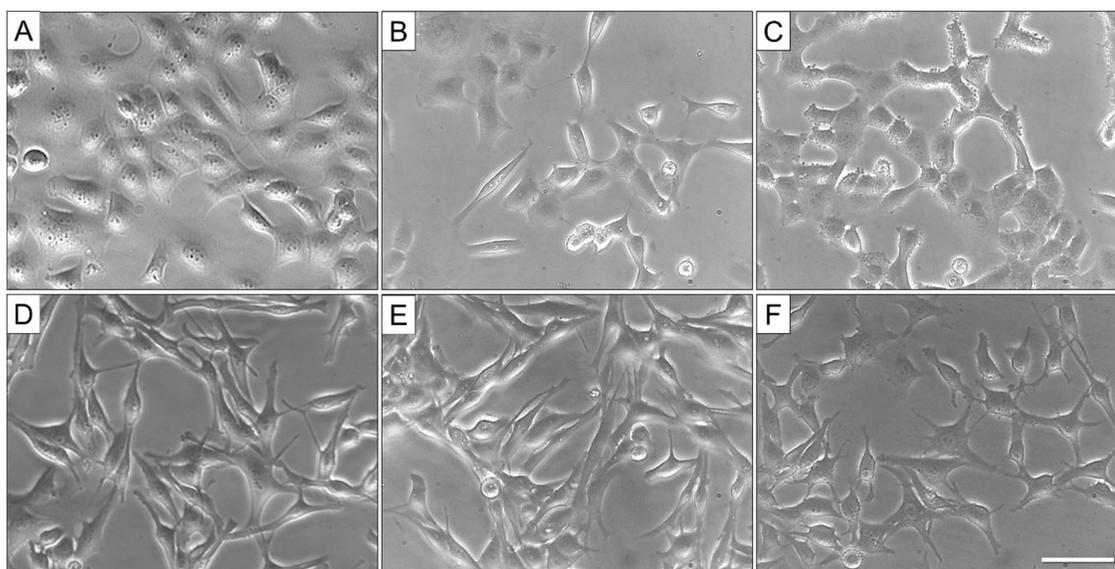


Figura 31. Aspectos morfológicos das células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 transfectadas com os plasmídeos pBABE_mock e pBABE_PTX3.

As células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 foram transfectadas com 400 ng dos plasmídeos pBABE_mock e pBABE_PTX3 utilizando o kit *Effectene Transfection Reagent* em meio DMEM contendo 10% de FBS e 2 mM de L-glutamina. A seleção clones transfectados foi feita pelo cultivo das células em presença do antibiótico puromicina. Micrografias representativas das culturas wild type (painéis A e D), transformadas com pBABE_mock (painéis B e E) e com pBABE_PTX3 (C e F) das células SK-Mel-37 (painéis A, B e C) e SK-Mel-188 (painéis D, E e F), respectivamente, apresentando transfecção estável do plasmídeo. Barra de escala: 50 μ m Magnificação de 200X.

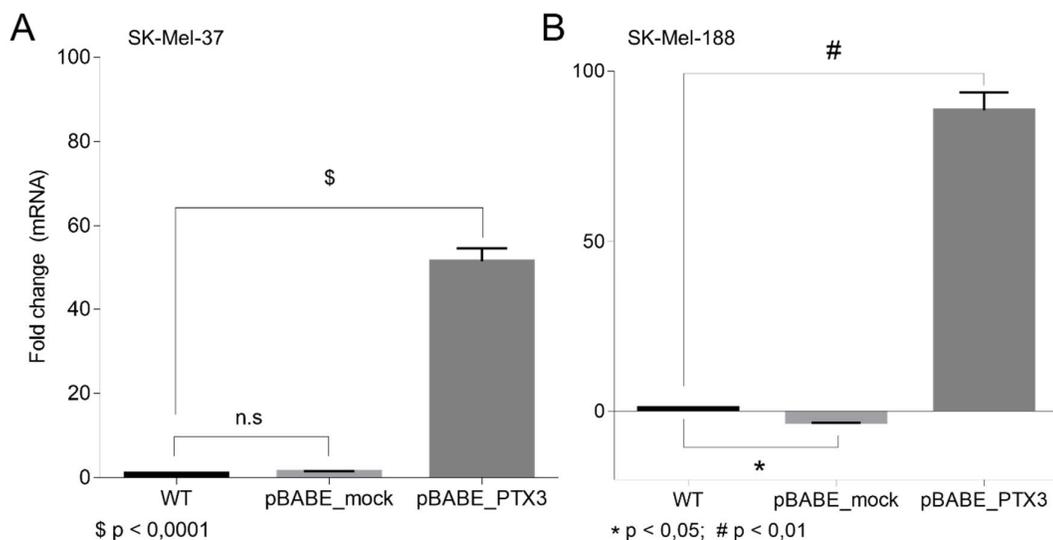


Figura 32. Análise da expressão gênica nas células de melanoma transfectadas

Os níveis de expressão do gene PTX3 nas células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 WT e transfectadas com os plasmídeos pBABE_mock e pBABE_PTX3 foram avaliados por RT-PCR em tempo real pelo método SYBR Green. O RNA total das células mantidas em cultura por 24 horas em DMEM 10% FBS contendo penicilina e estreptomicina (células WT) ou puromicina (transfectadas) foi extraído utilizando o TRIzol e o cDNA foi sintetizado pelo kit ImPromII usando oligo(dT)₂₀ ancorados. A PCR em tempo real foi efetuada em triplicata técnica a partir do cDNA diluído 1:10 de **(A)** SK-Mel-37 ou **(B)** SK-Mel-188 utilizando iniciador específico para PTX3 humano e a quantificação relativa foi calculada utilizando a equação de MW Pfaffl (2001) normalizado com GAPDH. Os resultados estão expressos em relação ao grupo WT que foi definido como tendo nível de expressão 1. Estatística: ANOVA one way.

5.8.1. Análise da proliferação das células de melanoma transfectadas

A proliferação das células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 tipo selvagem (WT) e transfectadas com os pDNAs pBABE_mock e pBABE_PTX3 foi avaliada pelo método do MTT nos tempos 24, 48 e 72 horas, conforme descrito no tópico 4.11.6 da página 72. Observamos que as células transfectadas com o plasmídeo pBABE_PTX3 tiveram suas taxas de proliferação celular significativamente inibidas em comparação ao grupo WT e pBABE_mock, em ambas as células. As diferenças na taxa de proliferação da SK-Mel-37 mock e PTX3 se deram nos tempos 48 horas: (MOCK \bar{X} 2,94 \pm 0,04 S.E.M, PTX3 2,2 \pm 0,06 p < 0,01) e 72 horas (MOCK 4,07 \pm 0,07, PTX3 2,76 \pm 0,08 p < 0,001, Figura 33A). É possível observar que as taxas de proliferação de MOCK são significativamente menores que

as células WT: 24 horas (WT $2,29 \pm 0,47$, MOCK $1,4 \pm 0,02$ $p < 0,01$), 48 horas (WT $5,4 \pm 0,07$, MOCK $2,94 \pm 0,04$ $p < 0,001$) e 72 horas (WT $5,79 \pm 0,24$, MOCK $4,07 \pm 0,07$ $p < 0,001$). Na linhagem SK-Mel-188 não foram observadas diferenças nas taxas de proliferação entre WT e mock, apenas entre WT x PTX3 e mock x PTX3 nos tempos: 48 horas (WT $5,06 \pm 0,4$, MOCK $4,5 \pm 0,3$, PTX3 $3,11 \pm 0,25$ $p < 0,01$) e 72 horas (WT $7,7 \pm 0,9$, MOCK $7,9 \pm 0,5$, PTX3 $5,72 \pm 0,2$, $p < 0,01$ WT x PTX3 e $p < 0,001$ MOCK x PTX3, Figura 33B). Os valores estão sendo reportados como sendo a proliferação relativa ao tempo 0 horas.

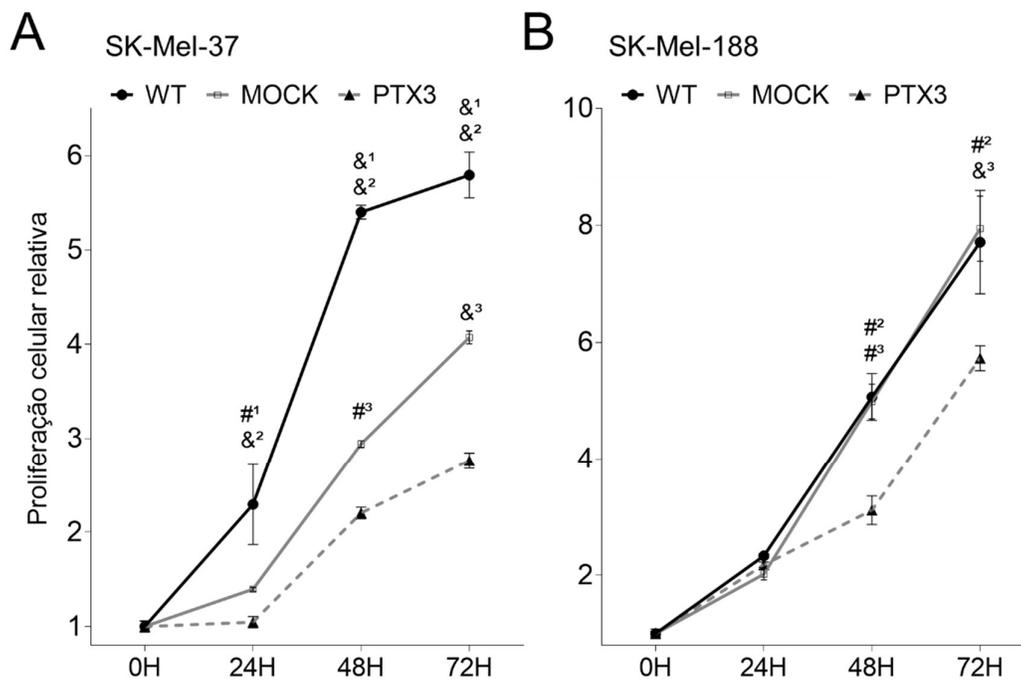


Figura 33. Análise da proliferação das células de melanoma transfectadas com PTX3

A proliferação das células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 WT e transfectadas com pBABE_mock e pBABE_PTX3 foi analisada pelo método MTT. As células foram plaqueadas em seis replicatas técnicas em poços de 0,9 cm² em 100 µl de meio DMEM 10% FBS e meio seletivo (DMEM 10% FBS com puomicina para as transfectadas) e foram incubadas por 24, 48 e 72 horas a 37 °C, 5% CO₂. Em seguida, 10 µl de MTT (5 mg/ml) foi adicionado e as células foram incubadas por mais 3 horas. O meio foi removido e adicionou-se 100 µl de 1:1 SDS 20% e dimetilformamida por 2 horas. A absorbância foi mensurada a 595 nm. Taxas de proliferação das células (A) SK-Mel-37 e (B) SK-Mel-188. Símbolos: WT x mock: #¹ $p < 0,01$; &¹ $p < 0,001$. WT x PTX3: #² $p < 0,01$; &² $p < 0,001$. MOCK x PTX3: #³ $p < 0,01$; &³ $p < 0,001$. N = 1 replicata. O cálculo da proliferação relativa ao tempo foi feito utilizando o valor de absorbância dos tempos 24h/0h, 48h/0h e 72h/0h.

5.9. Efeito da PTX3 no xenoinxerto tumoral

As células de melanoma SK-Mel-37 transfectadas com o vetor pBABE_mock e pBABE_PTX3 foram inoculadas nos dois flancos contralaterais traseiros (3 milhões de células em 100 µl de PBS1x esterilizado / flanco) de camundongos BALB/c atímicos nude *Foxn1^{nu/nu}* machos com 12 semanas de idade (n= 6 animais, 12 inóculos por grupo). A cada cinco dias, o peso do animal foi avaliado usando uma balança e os tumores medidos com o auxílio de um paquímetro. O volume do tumor foi calculado utilizando a fórmula $(D \times d^2)/2$; onde D: diâmetro maior, d: diâmetro menor do tumor. Os dados da Figura 34A mostram que os tumores provenientes das células transfectadas com o cDNA de PTX3 humano, apresentaram um volume tumoral significativamente menor que o derivado das células transfectadas com o vetor pBABE_mock a partir do 25º dia após o inóculo (MOCK \bar{X} 0,138 ± S.E.M 0,06 cm³ n = 8; PTX3 0,024 ± 0,02 cm³ p < 0,05 n = 5). É possível observar que o peso dos animais no grupo mock reduziu significativamente entre os 20º (28,3 ± 0,42 g) e o 39º (26,5 ± 0,4 g; p < 0,05) dia após o inóculo (Figura 34B). Alterações significativas no peso dos animais não foram observadas no grupo com PTX3.

No dia 42, os animais foram eutanasiados e os tumores foram coletados, pesados (Figura 34C) e fotografados (Figura 35 e Figura 36). Não foi observada diferença significativa entre o peso dos tumores no 42º dia (Figura 34C). Entretanto, o número e calibre dos vasos parecem ser maiores nos tumores do grupo mock em comparação aos tumores observados nos animais do grupo PTX3 (Figura 36). O *uptake* do tumor, neste ensaio preliminar, foi maior no grupo mock (5 de 6 camundongos) do que no grupo PTX3 (3 de 6 camundongos) (Tabela 11). Os tumores coletados foram então seccionados em duas metades sendo uma fixada em formalina para posterior análise histológica. A outra metade foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido e em seguida transferida para freezer -80 °C para subsequente extração de RNA total e análise de expressão gênica.

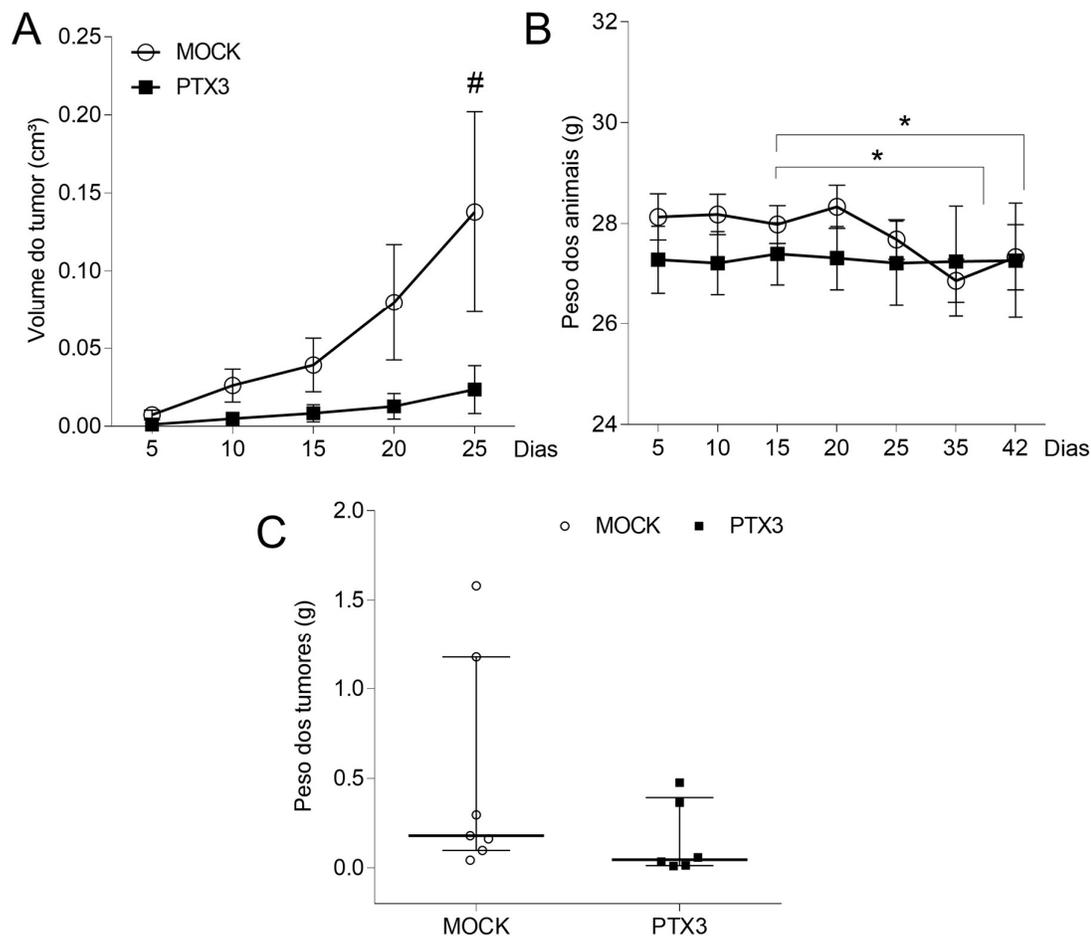


Figura 34. Análise do volume do tumor proveniente de xenoinxerto de células SK-Mel-37 transfetadas

Em cada um dos flancos traseiros de camundongos BALB/c *Foxn1^{nu/nu}* com 12 semanas de idade foram inoculados 100 μ l de uma suspensão, em PBS1X a 4 °C, contendo 3 milhões de células SK-Mel-37 transfetadas com pBABE_mock e pBABE_PTX3 (n=6 animais/grupo). Os animais foram mantidos sob condições SPF em sistema de racks ventiladas e sob regime de 12h luz e 12h escuro, recebendo ração e água autoclavada *ad libitum*. A cada 5 dias, **(A)** os tumores foram mensurados com o auxílio de um paquímetro e **(B)** o peso dos camundongos eram medidos com o auxílio de uma balança. O volume dos tumores foi calculado com a fórmula $(D \times d^2)/2$; onde D: diâmetro maior, d: diâmetro menor do tumor. **(C)** peso (gramas) dos tumores extraídos no dia 42. Valores de A e B: $\bar{X} \pm$ S.E.M; C: mediana com intervalo interquartil.

Tabela 11. Uptake dos tumores nos camundongos inoculados com células de melanoma transfetadas com PTX3 (SK-Mel-37 pBABE_PTX3) ou com o vetor vazio (SK-Mel-37 pBABE_mock)

Grupos	Nº de animais com tumor / Nº de animais inoculados	Nº de animais com tumores unilaterais	Nº de animais com tumores bilaterais
pBABE MOCK	5/6	1/6	4/6
pBABE_PTX3	3/6	1/6	2/6

Nº - número

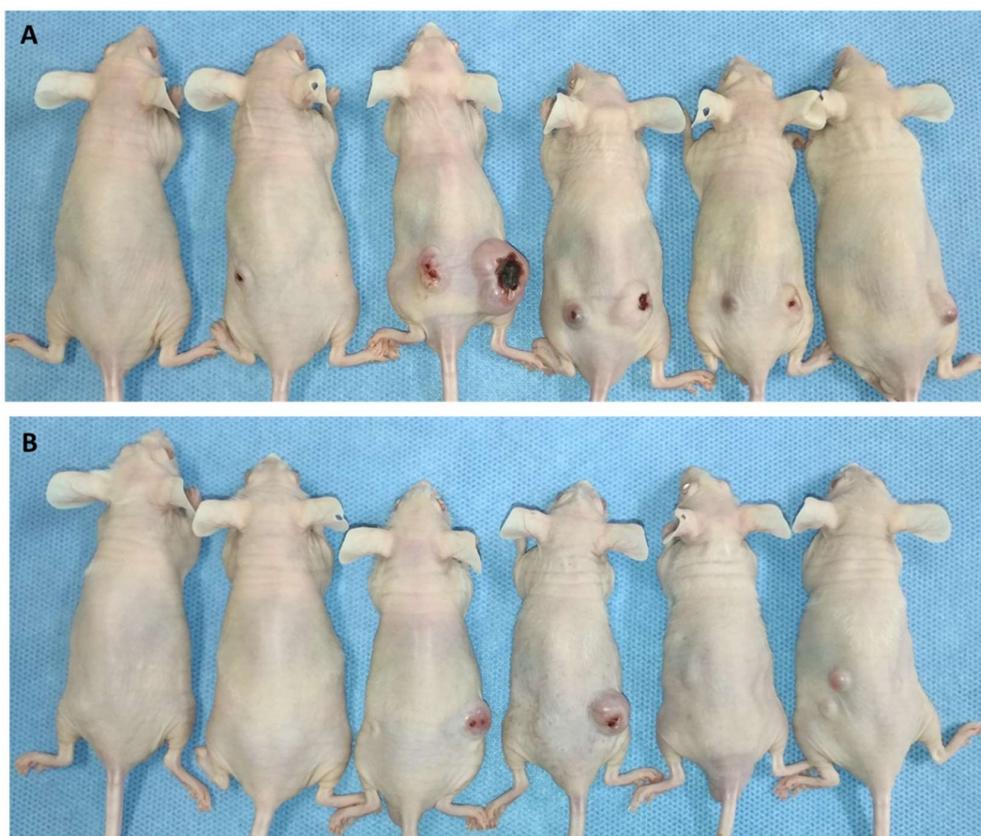


Figura 35. Aspecto externo dos melanomas de 42 dias induzidos em camundongos BALB/c nude.

Camundongos BALB/c nude foram inoculados bilateralmente com 3 milhões de células SK-Mel-37 transfetadas com pBABE_mock (painel A) ou com pBABE_PTX3 (painel B). Quarenta e dois dias depois, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente) e fotografados com câmera digital. N = 6 animais por grupo.

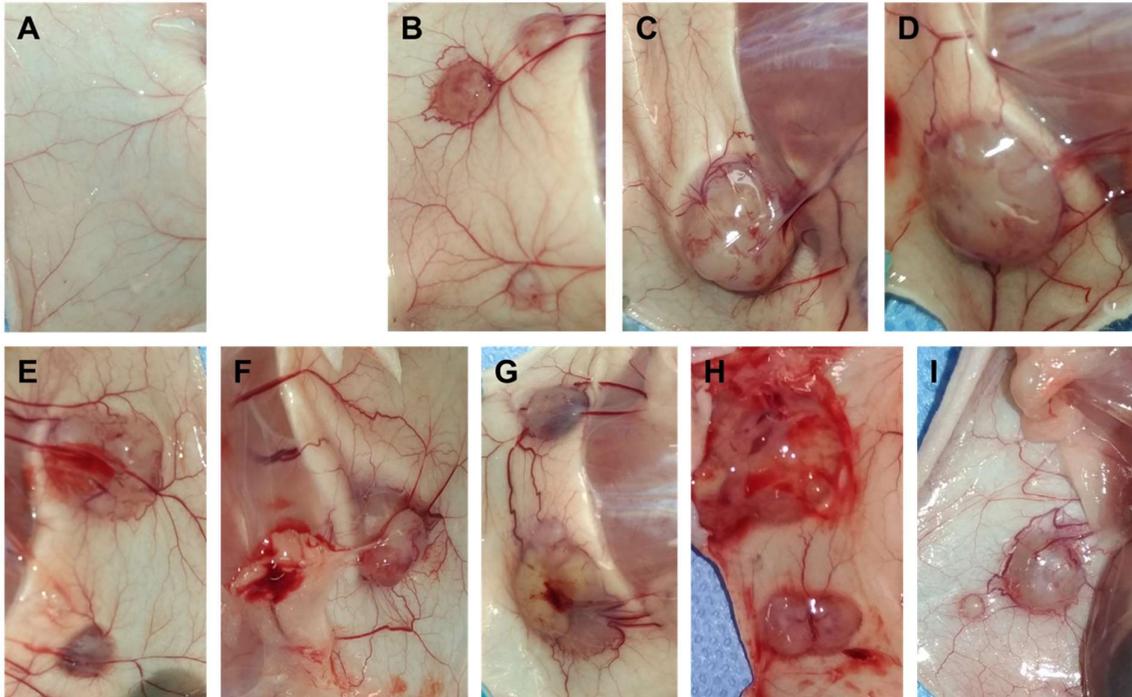


Figura 36. Aspecto dos tumores de 42 dias extraídos dos camundongos BALB/c nude inoculados com células de melanoma.

Camundongos BALB/c nude foram inoculados bilateralmente com 3 milhões de células SK-Mel-37 transfectadas com pBABE_mock ou pBABE_PTX3. Quarenta e dois dias depois, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente), os tumores foram expostos e fotografados com câmera digital. Painel A: pele sem tumor; Painéis B, C e D: tumores desenvolvidos nos animais inoculados com SK-Mel-37 pBABE_PTX3. Painéis E, F, G, H, I: tumores desenvolvidos nos animais inoculados com SK-Mel-37 pBABE_mock. N = 6 animais por grupo.

6. Discussão

Desde sua identificação, vários estudos têm sido realizados visando caracterizar a proteína PTX3, tanto estruturalmente, quanto funcionalmente. Estes estudos têm atribuído a PTX3 uma variedade de ações biológicas, que vão desde o reconhecimento e opsonização de patógenos (Diniz *et al.*, 2004), regulação da resposta imune inata e inflamação e até um papel crucial na fertilidade feminina (Garlanda *et al.*, 2005). PTX3 é uma glicoproteína de ação pleiotrópica, considerada o protótipo da subfamília das pentraxinas longas e faz parte da classe das proteínas de fase aguda, ou seja, seus níveis séricos aumentam subitamente (100 a 400 vezes) num período de 6 a 8 horas em resposta a infecção e a sinais pró-inflamatórios específicos (Lee *et al.*, 1993; Mairuhu *et al.*, 2005; Deban *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, várias funções regulatórias importantes foram atribuídas a PTX3 nos diferentes aspectos da progressão tumoral, como angiogênese e disseminação metastática e que suas funções podem ser tanto como um agente anti- ou pró-tumoral. Isso porque, foi mostrado que a PTX3 é capaz de estimular a migração das células de carcinoma pancreático e que os níveis de PTX3 no soro de estão associados a um mau prognóstico de pacientes com essa patologia (Kondo *et al.*, 2013). Outro estudo mostrou que o silenciamento de PTX3 foi capaz de inibir a viabilidade celular, a formação de colônias e induziu a parada do ciclo celular na fase G2/M de células de câncer cervical HeLa e SiHa *in vitro* e tumorigenicidade e potencial metastático *in vivo* (Ying *et al.*, 2016). PTX3 também é capaz de estimular a migração celular e o processo metastático osteolítico de células de câncer de mama MDA-MB-231 em resposta a estímulos de citocinas pró-inflamatórias como TNFA (Choi *et al.*, 2014).

Por outro lado, outros estudos vêm mostrando que a PTX3 também funciona como um agente anti-tumoral. Leali e colaboradores mostraram que PTX3 inibiu a angiogênese e progressão tumoral *in vivo* de células de carcinoma mamário murino S115 regulados por hormônios esteroides (DHT - dihidrotestosterona), através do bloqueio das atividades pró-angiogênicas de FGF8, isoforma b (Leali *et al.*, 2011). De forma similar, Ronca e colaboradores (2013) mostraram, em dois estudos, que PTX3 também inibiu a progressão de células câncer de próstata murina TAMP-C2 e

humana LNCaP reguladas por DHT e FGF2 ou FGF8b (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013) e a proliferação e migração celular dependente de FGF2 em células de melanoma murino B16-F10 e humano A375 (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Assim, levando em consideração essa dualidade de funções atribuídas a PTX3 no câncer, resolvemos aprofundar as investigações do papel dessa proteína em células tumorais que expressam constitutivamente os genes da via FGF2.

Os estudos iniciais sugestivos de que PTX3 poderia ter uma ação antitumoral, relacionavam esta atividade ao fato de sua interação (proteína:proteína) aos FGF2 e 8 inibir a ação pró-tumorigênica destes fatores. Os FGFs são proteínas cuja sinalização é parácrina com funções pleiotrópicas relacionadas a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, remodelação tecidual, interação célula-célula e angiogênese (Beenken e Mohammadi, 2009). A desregulação da expressão desses fatores é tida como um mecanismo importante para o sucesso da progressão neoplásica (Daniele *et al.*, 2012).

Assim, como primeira abordagem, fizemos um screening sobre a expressão dos FGFs e seus receptores tirosina-quinases específicos (FGFR 1 a 4) nas linhagens derivadas de tumores humanos que possuíamos no banco de células do laboratório LGEX. Usando como modelos experimentais células tumorais que expressassem os FGFs e seus receptores buscamos investigar as ações biológicas e a modulação da expressão de genes por PTX3 que pudessem interferir no desenvolvimento tumoral e malignidade. Assim, foram selecionadas como modelo as células de adenocarcinoma colorretal HT1080, o fibrosarcoma HCT 116 e os melanomas SK-Mel-37 e SK-Mel 188 que de acordo com os níveis de expressão relativa de FGF foram classificados em MID e LOW, pois as 3 primeiras linhagens expressavam níveis mais elevados de transcritos para FGF2 do que a última.

A primeira característica investigada foi a taxa de proliferação celular. Nossos achados mostraram um efeito inibitório consistente da proliferação celular promovida por PTX3 somente nas linhagens de melanoma humano. Nestas células também observamos que rhPTX3 inibe, *in vitro*, duas outras características importantes para o sucesso tumoral: a migração celular e o crescimento independente de ancoragem. A capacidade de inibição do crescimento tumoral por

PTX3 foi também evidenciada no modelo experimental *in vivo* onde o tumor induzido nos camundongos nude pela injeção dos melanomas transfectados com PTX3 cresceu numa taxa menor do que a observada nos tumores dos camundongos controle.

Outro aspecto importante, foi o efeito modulatório de PTX3 sobre genes associados à inflamação e angiogênese na linhagem de melanoma SK-Mel-37. Nas células de fibrossarcoma HT-1080 e adenocarcinoma colorretal HCT-116 a proteína PTX3 também modulou os genes relacionados a inflamação e angiogênese, mas sem prejuízo a proliferação celular destas linhagens. Com relação a expressão de miRNAs relacionados à progressão de melanomas, observamos efeitos contrastantes em resposta ao tratamento com a PTX3 nas células de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188.

Os dados obtidos das linhagens de fibrossarcoma humano HT-1080 (FGF2^{MID}), indicaram que a utilização da proteína rhPTX3 foi incapaz de modular tanto positivamente quando negativamente a proliferação (Figura 12, página 81) e a migração celular desta linhagem (Figura 16, página 85). Porém, rhPTX3 modulou negativamente a expressão de PTX3 e de VEGFA, principal fator angiogênico, o que sugere que, no contexto *in vivo*, PTX3 pode afetar a angiogênese tumoral. Essa hipótese encontra apoio em dados recém-obtidos pelo nosso grupo (Rodrigues, P.F. 2018, em elaboração), que mostraram que a progressão de tumores induzidos em camundongos pela inoculação em camundongos NOD/SCID de células HT-1080 transfectadas com o cDNA de PTX3 é bastante inibida, com forte correlação com uma diminuição da angiogênese tumoral. No contexto deste trabalho, a linhagem HT-1080 já expressa altos níveis de PTX3 de forma endógena (PTX3^{HIGH}) o que pode explicar a possível ausência de efeito do tratamento com a rhPTX3 na proliferação celular *in vitro* desta linhagem. Uma abordagem metodológica que já está em andamento por outro membro do laboratório é o silenciamento do gene de PTX3 nas células HT-1080.

Referente às células de câncer colorretal HCT-116, identificamos que o tratamento com PTX3 reduziu o número de transcritos codificados a partir do gene de PTX3, FGFR4 e do fator de necrose tumoral (TNFA) em aproximadamente em

40% (Figura 21, página 96). Apesar de não termos observados efeitos promovidos por PTX3 na proliferação celular da linhagem HCT-116 *in vitro*, a modulação negativa de FGFR4 por PTX3 pode sinalizar a possibilidade de algum efeito da proteína sobre essa linhagem celular, o que ainda precisa ser melhor investigado. Enquanto que o gene TNFA codifica uma proteína que desempenha uma série de funções na homeostase imune, na regulação apoptótica, na proliferação celular e na inflamação (Zins *et al.*, 2007). Já foi mostrado que a inibição do fator TNFA é importante para o tratamento de indivíduos com câncer de cólon provenientes de colite ulcerativa (Popivanova, 2008). Também foi descrito que em células de câncer de cólon humano SW620, o bloqueio de TNFA inibe a proliferação dessa linhagem (Zins *et al.*, 2007) e que a expressão de TNFA está relacionada ao aumento da atividade metastática de células CHO (*chinese hamster ovary*) inoculadas em camundongos Nude (Malik *et al.*, 1990).

Em nenhuma das células analisadas foi detectado aumento no índice proliferativo promovido por PTX3. A cultura das células em condições de baixo soro (2%) teve como objetivo avaliar a capacidade das diferentes linhagens de proliferarem sob estas condições. No sistema imune, PTX3 apresenta uma natureza de caráter dual, ou seja, a depender do patógeno, a presença de PTX3 pode ser protetora ou deletéria (Soares *et al.*, 2006; Moalli, Jaillon, *et al.*, 2011). Amparado pela dualidade de papéis de PTX3, foi apropriado avaliar alguma possível atividade pró-proliferativa mediada por PTX3 e para isso, as células foram também foram cultivadas e tratadas em baixa concentração de soro. Uma vez que o FBS é um importante suplemento aditivo para meios de cultura composto principalmente por fatores que estimulam o crescimento celular com pouco ou nenhum fator inibitório (Zheng *et al.*, 2006), o ensaio com alta concentração de soro (10%) poderia mascarar um possível efeito pró-proliferativo promovido por PTX3.

De forma similar ao apresentado nesse trabalho, Ronca e colaboradores mostraram que a expressão aumentada de PTX3 inibe a proliferação de células altamente tumorigênicas de melanoma murino B16-F10 após estímulo de FGF2 exógeno (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). A associação FGF2/FGFR é descrita como um sistema que desempenha papel importante na progressão tumoral de melanomas (Tsunoda *et al.*, 2007) e de câncer de cólon (Lieu *et al.*, 2011). Com

base nessas referências, é natural sugerirmos que a ação inibitória de PTX3 nas células tumorais humanas avaliadas nesse trabalho também pode estar relacionada à inibição do efeito pró-proliferativo mediado pelo sistema FGF2/FGFR4.

Em humanos, o FGFR4 é descrito como sendo o principal receptor de FGF2, seguido por FGFR3 e FGFR1 (Ornitz *et al.*, 1996). Já FGFs são proteínas de ligação específicas que estabilizam a ligação de FGF2 aos seus receptores. Obtivemos dados consistentes que mostraram a expressão aumentada de FGFR4 e FGFBP em SK-Mel-37, o que sugere um mecanismo compensatório da inibição da expressão de FGF2 em resposta ao tratamento com PTX3. O FGFR4 é um receptor que também é ativado por muitos outros ligantes parácrinos pró-proliferativos e pró-angiogênicos da família FGF, como o FGF1 e FGF4 (Ornitz *et al.*, 1996; Beenken e Mohammadi, 2009). As funções de FGF1 e FGF4 na patogênese do câncer já são bem descritas (Qi *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2016), porém, com relação ao desenvolvimento e progressão de melanomas, a literatura atual é escassa. Assim, apesar da expressão aumentada de FGFR4 e FGFBP em SK-Mel-37 sinalizar um aumento na proliferação celular, o tratamento com a PTX3 foi suficiente para inibir, mesmo que de maneira discreta, a proliferação celular de SK-Mel-37, como de fato constatamos (Figura 11, página 80).

Com relação a modulação da expressão de FGF2 no melanoma SK-Mel-37, obtivemos dados antagônicos. Foi observado que o tratamento com rhPTX3 por 3 ou 24 horas induziu a expressão de FGF2 (Figura 23, página 98), sugerindo uma breve resposta compensatória num *loop* autócrino de estímulo proliferativo, o que poderia inclusive justificar, junto com o aumento da expressão de FGFR4 e FGFBP, o porquê da inibição da proliferação celular ter sido discreta. Entretanto, também obtivemos resultados que mostram a expressão diminuída de FGF2 nos tempos 3 e 24 horas após o tratamento com rhPTX3 (Figura 24, páginas 99). Nesse caso, o sequestro de FGF2 por PTX3 endógeno sinaliza para a regulação negativa do FGF2 endógeno, o que estaria contribuindo para a inibição da proliferação celular. Porém, esses dados não são suficientes sobre a ação de PTX3 na expressão de FGF2, exigindo a realização de novas replicatas experimentais que confirmem esse cenário.

Enquanto na linhagem SK-Mel-37 tivemos mudanças nos níveis de expressão de transcritos, em SK-Mel-188 não houve modulação da expressão gênica em resposta ao tratamento com rhPTX3 (Figura 22, página 97). Os efeitos diferentes observados nas duas linhagens de melanoma podem ser explicados pela diferença no estágio do tumor de origem das linhagens. A linhagem SK-Mel-37 é um melanoma do tipo epitelióide, cuja análise de antígenos de superfície celular revelam que as células são positivas para A010, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e proteoglicanos de sulfato de condroitina associado a melanoma (mCSP – *melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan*), antígeno de diferenciação de melanócitos. Esses marcadores indicam que a linhagem SK-Mel-37 é proveniente de um melanoma de fase precoce (N. *et al.*, 1987). Já a linhagem SK-Mel-188, possui morfologia do tipo fusiforme, com processos dendríticos longos, e é descrita como sendo proveniente de melanoma de fase tardia, uma vez que os marcadores de superfície mais proeminente expressos são C350, CF21, TA99, Mel 1 e M144 (Carey *et al.*, 1976; N. *et al.*, 1987). Outra característica que distingue as duas células é o nível de atividade da tirosinase, uma metaloenzima que controla a produção de melanina. Houghton e colaboradores (1987) avaliaram a atividade da tirosinase na SK-Mel-37 e SK-Mel-188 e constataram que linhagem SK-Mel-37 é um melanoma do tipo amelanocítico, por possuir níveis atividade de tirosinase iguais às de um câncer renal controle (SK-RC-6, não melanocítico), enquanto a SK-Mel-188 produz alta quantidade de melanina (7,6x mais que em SK-RC-6). A produção exagerada de melanina é descrita como um fator que dificulta o sucesso de abordagens terapêuticas baseadas na radioterapia (Brożyna *et al.*, 2016).

Identificamos, de maneira inédita, que os transcritos de PTX3 estão em níveis muito mais baixos nas células de melanoma de fase tardia (SK-Mel-188) quando comparado às células de melanoma de fase precoce (SK-Mel-37) (Figura 10). A perda de expressão de PTX3 no desenvolvimento dos melanomas pode ser um sinal de mau prognóstico e a investigação da relação de PTX3 com a progressão dos tumores é um processo que precisa ser esclarecido de forma a propor essa molécula como um biomarcador da progressão de melanomas.

Também mostramos que o tratamento com a proteína PTX3 exógena afeta tanto a migração, quanto o crescimento independente de ancoragem dessas

linhagens. A capacidade de sobreviver e crescer na ausência de um substrato de ancoragem, como a matriz extracelular (ECM) em tecidos e em contato com células vizinhas é uma das principais características de células não-neoplásicas transformadas e de células tumorais (Mori *et al.*, 2009). A perda dessa dependência está fortemente relacionada ao potencial tumorigênico das células, propriedade das células tenderem a crescer e sobreviver em locais inapropriados *in vivo*, facilitando a invasão e metástase tumoral. Esta característica é descrita como um fator que categoriza os tumores em malignos e benignos (Mori *et al.*, 2009; Anchorage-Independent Cell Growth, 2012).

Nossos dados indicaram que rhPTX3 diminuiu substancialmente a área total das colônias das linhagens de melanoma após três semanas de tratamento (Figura 17, página 87). Na literatura, esse fenômeno também foi observado na linhagem murina de melanoma B16-F10 transfectadas com cDNA de PTX3, onde os autores descrevem que PTX3 foi capaz de modular a expressão de genes relacionados com o processo da transição do fenótipo epitelial para mesenquimal (EMT) (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Esse processo permite com que células epiteliais polarizadas, que normalmente interagem com a membrana basal através da superfície basal, passem por profundas mudanças bioquímicas que as permitem assumir um fenótipo de células mesenquimais, como capacidade de migração e invasão ampliada, resistência aumentada à apoptose e produção exagerada de componentes da matriz extracelular, como SNAI1 (proteína *zinc finger* SNAI1), SNAI2 (ou Slug), FOXC2 (proteína *foxhead box C2*), N-caderina, fibronectina, além dos microRNAs miR10b e miR21 (Kalluri e Weinberg, 2009).

Neste sentido, foram desenhados iniciadores para análise de expressão por RT-PCR em tempo real de genes envolvidos tanto no processo EMT (caderina epitelial CDH1 e mesenquimal CDH2), quanto genes que codificam proteínas de junções-gap de comunicação celular (conexina 43 - GJA1, *gap junction protein alpha 1*) nas linhagens SK-Mel-37 e SK-Mel-188, foram desenhados tratadas com PTX3 ou transfectadas com o vetor de expressão deste gene. Esses dados poderão contribuir para um melhor entendimento do papel de PTX3 na interação célula-célula e no processo EMT. A lista destes iniciadores está descrita no APÊNDICE 5 e os mesmos já se encontram em processo de otimização.

A migração celular de ambas as linhagens de melanoma também foi afetada pelo tratamento diário com rhPTX3 (Figura 15, página 84). O mecanismo da migração é um ponto central para o sucesso da metástase tumoral, ou seja, a motilidade permite que uma célula neoplásica invada vasos sanguíneos e linfáticos circundantes, se espalhando e afetando órgãos distantes. Para se espalhar nos tecidos, as células tumorais utilizam os mesmos mecanismos de migração (como modificação na morfologia, polaridade e rigidez celular) que ocorrem em células não-neoplásicas durante os processos fisiológicos, como morfogênese embrionária, regeneração tecidual e o arranjo das células do sistema imune durante uma inflamação (Friedl e Wolf, 2003).

Com a finalidade de minimizar o efeito que a proliferação celular teria sobre o fechamento da lesão, mascarando o processo migratório das células, utilizamos um antibiótico chamado mitomicina C (MMC), que bloqueia a replicação do DNA e a transcrição do RNA, inibindo a síntese proteica e a consequente atividade proliferativa (Verweij e Pinedo, 1990). Assim, foi necessário otimizar as concentrações e tempo de tratamento com MMC nas diferentes células, uma vez que o tratamento prolongado causa morte celular. Então, as células de melanoma da linhagem SK-Mel-37 foram tratadas por 16 horas com MMC e a SK-Mel-188 foi tratada por 8 horas com MMC antes do tratamento diário com rhPTX3 e a migração celular foi acompanhada até o fechamento completo da lesão. Observamos que na linhagem SK-Mel-188 a migração celular foi inibida no tempo 72 horas tanto na comparação entre os grupos controle (apenas DMEM) e tratado com rhPTX3, como nos grupos controle (MMC) e tratado (MMC+PTX3) que receberam MMC. O mesmo fenômeno foi observado no tempo 96 horas, porém, as diferenças estatísticas foram observadas apenas nos grupos MMC+PTX3 e PTX3.

Na linhagem SK-Mel-37, observamos que a inibição da migração celular se deu apenas quando comparando os grupos controle (DMEM) com os grupos MMC e MMC+PTX3, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos MMC e MMC+PTX3. O tratamento com rhPTX3 não modificou as taxas de migração celular em HT-1080 (regenera a lesão em 8 horas). Os dados achados com a linhagem SK-Mel-188 indicam a possibilidade de PTX3 afetar a motilidade celular nas células de melanoma que expressam FGF2 e que estão em estágio tardio.

Nossos dados encontram respaldo na literatura onde é relatado que PTX3 inibe a migração de fibroblastos e de plasmócitos provenientes de pacientes com mieloma múltiplo (MM), impactando na angiogênese de MM mediada por FGF2 (Basile *et al.*, 2013). De forma similar, foi mostrado que a migração de células dependente do sistema FGF2/FGFR em melanoma murino também foi afetada pela expressão aumentada de PTX3 (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013).

Um detalhe interessante que observamos foi o aumento da expressão de IL8 na linhagem de SK-Mel-37, 24 horas após o tratamento com a rhPTX3 (Figura 23, página 98). Apesar desse fenômeno ter acontecido apenas em uma das replicatas, resolvemos discutir esse dado uma vez que a IL8 é uma importante citocina descrita como sendo indutora da angiogênese e da migração em melanomas através de um sistema autócrino de estimulação e que a regulação positiva de IL8 em células de melanoma está amplamente relacionada com o potencial metastático (Luca *et al.*, 1997). Elaboramos uma hipótese de que as células de melanoma SK-Mel-37 estariam aumentando a expressão de IL8 em resposta a rhPTX3 como sendo um mecanismo de escape para manutenção do seu potencial maligno, entretanto essa hipótese precisará ser investigada. Nesta mesma replicata, observamos que a expressão de TNFA foi regulada positivamente em resposta a rhPTX3. TNFA foi inicialmente caracterizado como uma molécula citotóxica para células cancerosas, entretanto atualmente TNFA é descrito como um fator pleiotrópico e com papel antagônico em melanomas, onde sua regulação positiva pode tanto inibir quando promover o crescimento tumoral, neste último caso agindo como indutor da invasão celular e do angiotropismo (mecanismo em que as células de melanoma se aproximam da superfície luminal de vasos sanguíneos ou linfáticos) (Sharfman, 2012; Donia *et al.*, 2016).

Neste trabalho também fizemos uma avaliação do impacto da rhPTX3 na expressão de doze microRNAs (miRNA) relacionados com a tumorigênese, em especial a progressão de melanomas, e com miRNAs preditos de se ligarem a PTX3, nas linhagens SK-Mel-37 e SK-Mel-18. Os miRNA são oligonucleotídeos pequenos, de aproximadamente 22 nucleotídeos e podem regular a tradução de centenas de genes através de sítios específicos de ligação a RNA mensageiros, que dependendo do grau de complementariedade entre as fitas de mRNA-miRNA, pode

resultar na inibição da tradução e/ou a degradação completa do mRNA (Bartel, 2005). A descoberta dos miRNAs trouxe à tona novos mecanismos moleculares para o contexto da tumorigênese, que acreditava-se estar relacionada apenas por alterações genética e/ou epigenéticas em oncogenes ou genes supressores de tumor (Melo e Esteller, 2011).

Calin e colaboradores (2004) mostraram que aproximadamente 52% dos genes de miRNA estão localizados em regiões genômicas associadas ao câncer, em regiões de perda de heterozigidade, regiões de translocação, ou em sítios “frágeis”, como as pontas centroméricas e teloméricas (Calin *et al.*, 2004). Nesses casos os miRNAs podem funcionar como oncogenes ou genes supressores de tumor. As funções atribuídas aos miRNAs oncogenes, que são normalmente expressos em cânceres, é a de suprimir os genes supressores de tumor, enquanto os miRNAs do tipo supressor de tumor estão normalmente regulados negativamente em alguns tipos de câncer e acredita-se que estes miRNAs possuem oncogenes como alvos (Shatseva *et al.*, 2011). Na biogênese dos miRNA, a estrutura em *loop* do pré-miRNA pode gerar duas fitas que serão complementares ao mRNA alvo, a fita 5p (ou *forward* 5'-3') e a fita 3p (*reverse* 3'-5'), cuja estabilidade será determinante para a fita entrar no complexo RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA) e assim se ligar ao seu alvo (Bartel, 2009).

Assim, utilizamos o software IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) e da busca na literatura sobre miRNAs e câncer para fazer a seleção dos miRNAs candidatos (APÊNDICE 7). O IPA é uma ferramenta poderosa de busca de dados ‘omics (genômica, transcriptoma, proteoma e metaboloma), capaz de identificar novos alvos ou biomarcadores candidatos no contexto dos sistemas biológicos. Usando esta ferramenta, foram selecionados os seguintes miRNAs maduros humanos: hsa-miR-10a-5p; hsa-miR-17-5p; hsa-miR-21-5p; hsa-miR-29b-3p; hsa-miR-149-5p; hsa-miR-150-5p; hsa-miR-155-5p; hsa-miR-188-5p; hsa-miR-199a-3p; hsa-miR-208a-3p; hsa-miR-210-3p; hsa-miR-214-3p; hsa-miR-221-3p; hsa-miR-491-5p como alvos para este estudo. A tabela do APÊNDICE 7 mostra em quais tumores esses miRNA já foram descritos.

Para nossos experimentos, fez-se necessário um *screening* inicial dos miRNAs elencados acima que estariam diferencialmente expressos em resposta a rhPTX3 nos tempos 3 e 24 horas. Para isso, as reações de PCR em tempo real foram feitas utilizando apenas duplicata técnica de cada cDNA e os que estivessem diferencialmente expressos seriam avaliados utilizando triplicata técnica dos cDNA em três experimentos independentes. Nossos dados preliminares mostraram que a proteína PTX3 modulou positivamente a expressão do microRNA supressor de tumor miR-188 apenas no tempo de 3 horas nas células SK-Mel-37 (Figura 27A) e negativamente a expressão do microRNA oncogênico miR-149 nas células SK-Mel-188, também com 3 horas após o tratamento (Figura 27C). Consideramos esses resultados como preliminares uma vez que quando prosseguimos as análises utilizando outras duas replicatas independentes, não observamos o mesmo efeito estatisticamente significativo, embora pareça haver uma tendência de aumento da expressão do miR-188 e uma diminuição do miR-149 na replicata 02 (Figura 28).

Esses dados ressaltam a necessidade de aprofundamento das investigações da ação de PTX3 sobre esses miRNAs, uma vez que já foi mostrado que a expressão deficiente do miR-149 foi capaz de comprometer a sobrevivência de células de melanoma e de inibir o crescimento tumoral *in vivo*, enquanto que a expressão aumentada de miR-149 foi encontrada em isolados de melanoma metastáticos humanos (Jin *et al.*, 2011). É importante salientar que o miR-149 está associado ao aumento da expressão de TP53 mutante em células de melanoma, fazendo com que a proteína TP53 falhe em atuar como um supressor de tumor efetivo, contribuindo para a sobrevivência das células de melanoma (Jin *et al.*, 2011). Entretanto, outro mecanismo que pode justificar a necessidade do aprofundamento da investigação dos efeitos de PTX3 sobre a expressão do miR-149 em melanomas é que, enquanto a inibição do miR-149 favorece as ações do supressor de tumor TP53, predições em bancos de dados de miRNA mostram que o miR-149 tem como alvo o mRNA de ST13 (p48, supressão da tumorigenicidade 13).

A proteína ST13 possui funções duais dependendo do tipo de câncer, por exemplo, foi mostrado que a expressão aumentada de ST13 é capaz de inibir a proliferação, migração e formação de colônia de células de câncer colorretal *in vitro* (Bai *et al.*, 2012), enquanto que o aumento da expressão de ST13 é um indicativo de

mau prognóstico em melanomas, pois os níveis de ST13 foram encontrados aumentados em melanomas em fase de crescimento vertical e fase metastática (McDonald *et al.*, 2004), funcionando, assim, como um fator oncogênico para melanomas (Pisapia *et al.*, 2015). Assim, se por um lado, a inibição de miR-149 poderia ser um mecanismo pelo qual PTX3 inibiria a progressão tumoral de melanomas, por outro lado poderia provocar um aumento da expressão de ST13, que é considerado de mau prognóstico em melanoma.

Com relação ao microRNA miR-188, a principal função atribuída a ele em câncer é a de supressor de tumor (APÊNDICE 7). As funções do miRNA-188 estão principalmente associadas ao controle da proliferação e do ciclo celular, através de uma regulação negativa das fases G1/S, que normalmente estão ativas constitutivamente por heterodímeros formadas por ciclinas e quinases dependentes de ciclinas, como a CCNG1 (ciclina G1) (Wu *et al.*, 2014). Porém, de forma similar ao observado com o miR-149, cuja inibição prejudica a progressão do melanoma via TP53 e favorece via ST13, predições indicam que o miR-188 tem como alvo o supressor de tumor PTEN (homólogo fosfatase e tensina). A perda de função de PTEN é amplamente conhecida como fator determinante para a sobrevivência e expansão de melanomas, pois PTEN controla negativamente a ativação da via PI3K-AKT, favorecendo o aumento da sensibilidade das células de melanoma aos estímulos pró-apoptóticos (Stahl *et al.*, 2003). Pelos motivos antagônicos dos miRNA-149 e miR-188 acima mencionados, a modulação destes miRNAs por PTX3 deve ser investigada minuciosamente para que seja possível entender o balanço na expressão dos miRNA com funções pró- e antitumorais em melanomas.

Quando fizemos uma comparação de expressão de miRNA entre as células, identificamos que o miRNA-199a-3p é expresso na linhagem SK-Mel-37, mas não é expresso na SK-Mel-188, enquanto que os miR-150 e miR-155 não são expressos em nenhuma das linhagens de melanoma (Figura 27, página 103). Funções atribuídas ao miR-199a incluem a promoção da proliferação e sobrevivência de células endoteliais e de células de câncer de mama MDA-MB-231, por inibirem a expressão endógena de caveolina-2 (CAV2), proteína considerada um supressor de tumor, componente essencial da superfície interna das cavéolas – pequenas invaginações da membrana plasmática envolvida na transdução de sinal,

metabolismo de lipídios, controle do crescimento celular e apoptose. (Shatseva *et al.*, 2011). No caso dos melanomas, foi descrito que a fita *forward* do miR-199a (5p), funciona como um inibidor da proliferação celular, parando o ciclo celular na fase G1 em células de melanoma B16 e HME1 *in vitro* e por regular negativamente HIF1A (fator 1A induzido por hipóxia) em camundongos *Foxn1^{nu/nu}* inoculados com células B16 transfectadas com miRNAs sintéticos de mR-199a-5p (Yang *et al.*, 2016). Outro estudo também descreveu miR-199a-3p e 5p como promotores de invasão metastática, angiogênese e colonização de melanomas A375 (Pencheva *et al.*, 2012). Levando estes dados em consideração, é importante investigar o padrão de expressão do miR-199a-3p em melanomas de diferentes estágios, para que se possa entender as funções desse microRNA em melanomas e possivelmente classificá-lo como um biomarcador de melanomas em estágio precoce.

Neste trabalho, também conseguimos gerar linhagens estáveis de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 transfectadas com o cDNA completo de PTX3. Foi observado, por análise de expressão de transcritos por RT-PCR em tempo real, que as linhagens transfectadas com PTX3 passaram a expressar 50 vezes mais o gene de PTX3 em relação as células transfectadas com o vetor vazio. Esse aumento no nível de transcrito gerou sérias implicações para as taxas de proliferação celular. Pudemos constatar que, tanto SK-Mel-37_pBABE/PTX3, quanto SK-Mel-188_pBABE/PTX3 tiveram suas taxas de proliferação severamente diminuídas, quando comparamos com o grupo mock e também quando levamos em consideração as células tratadas com a rhPTX3.

Evidentemente que o nível aumentado de expressão do transcrito de PTX3 nas células transfectadas não reflete diretamente na expressão da proteína PTX3 funcional. Mecanismos de regulação pós-transcricionais, incluindo *splicing* de mRNA, degradação de mRNA por miRNAs, eventos de translação e pós-translacional, modificam e afetam a estabilidade das proteínas, assim modificando a relação entre as taxas de mRNA transcritos com as proteínas sintetizadas (Day e Tuite, 1998; Chang e Hla, 2014). Entretanto, na ausência de anticorpos específicos para PTX3 que nos permitisse realizar os experimentos de Western Blot a partir do lisado celular e/ou ELISA utilizando meio condicionado, para avaliar a expressão

proteica de PTX3, apoiamo-nos nos resultados de expressão gênica e de proliferação celular para justificar o ensaio de tumorigênese experimental.

Nossos dados dos ensaios *in vivo* são sugestivos da existência de um impacto de PTX3 sobre o *uptake*, angiogênese e crescimento do melanoma SK-Mel-37 em camundongos machos *Foxn1^{nu/nu}*. Este resultado é corroborado pelo trabalho publicado por Ronca e colaboradores (2013), que mostraram que a PTX3 também foi capaz de inibir a progressão tumoral *in vivo* de melanoma murino altamente tumorigênico B16-10 inoculados em camundongos C57BL/6 (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Os autores atribuíram o prejuízo na progressão tumoral em resposta a PTX3 por conta da inibição dos vários fenômenos que também foram analisados nesse trabalho, como a migração, proliferação e crescimento independente de ancoragem. Apesar de Ronca ter publicado um artigo bem elegante e muito similar ao nosso, o grande destaque deste trabalho é a utilização do modelo de células tumorais humanas com diferentes estádios de malignidade, onde mostramos que PTX3 também é capaz de inibir a progressão tumoral de melanoma humano.

Além dos efeitos observados acima, isto é, proliferação celular e progressão tumoral, foram identificadas mudanças na morfologia das células SK-Mel-37 transgênicas para PTX3. Em comparação com as células pBABE_mock, as células pBABE_PTX3 passaram a apresentar estruturas semelhantes aos *blebbings* (bolhas) de membrana ou mesmo estruturas vesiculares funcionais (Figura 31, página 110). A relação entre PTX3 e estes *blebs* ainda não foi reportada na literatura. As bolhas de membrana são normalmente classificadas como protrusões de aspecto volumoso e arredondado, com aproximadamente 2 μm de diâmetro e reguladas pelo citoesqueleto, cuja funções estão associadas a apoptose, excreção, citocinese e/ou motilidade celular (Fackler e Grosse, 2008).

No que se refere a motilidade celular, as células neoplásicas são conhecidas por adotar dois tipos principais de invasão: degradação proteolítica da matriz extracelular adjacente e/ou adoção de uma motilidade do tipo mais ameboide, que é frequentemente acompanhada por bolhas de membrana (Sahai, 2005; Fackler e Grosse, 2008). Adicionalmente, Sahai e Marshall (2003), mostraram que células de melanoma A375 usam preferencialmente o modo ameboide associado a blebbing

para invasão celular, em vez da proteólise pericelular (Sahai e Marshall, 2003). Levando isso em conta, poderíamos sugerir que a transfecção de SK-Mel-37 com PTX3 estaria aumentando o potencial invasivo, por conta do aumento significativo de blebs de membrana.

Outra hipótese é de que as estruturas observadas são vesículas de membrana, que em eucariotos funcionam para o transporte de proteínas solúveis entre compartimentos sub-celulares, como as cisternas de Golgi e endossomos multivesiculares e/ou vesículas de membrana formadas a partir da membrana plasmática, como microvesículas externalizada por células secretoras (Théry *et al.*, 2009). Assim, essas vesículas podem estar envolvidas no transporte e secreção de PTX3, que é uma proteína de fase fluida. Portanto, para que possamos caracterizar e melhor descrever que estruturas são essas, já foram preparados precipitados de células fixadas de melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 do tipo selvagem (WT), transfectadas com o plasmídeo vazio e com o vetor de expressão de PTX3, que serão analisadas por microscopia eletrônica de transmissão no centro de microscopia da UFMG em colaboração com a Dra. Luciana de Oliveira Andrade, professora do Departamento de Morfologia do ICB da UFMG.

Nosso conjunto de dados indica que PTX3 inibe a progressão tumoral em células de melanoma que expressam os transcritos FGF2/FGFBP/FGFR4. O mecanismo de ação clássico atribuído a PTX3 é o bloqueio da ativação do receptor FGFR4, pelo sequestro de FGF2. Com os dados desse trabalho, também podemos sugerir, que PTX3 age inibindo a expressão gênica de FGF2, inibindo as atividades biológicas desse fator, e de maneira preliminar, que PTX3 pode estar alterando a dinâmica de miRNAs envolvidos na melanogênese, mas novos estudos precisarão ser feitos para confirmação destes dados. Também mostramos que PTX3 foi capaz de inibir diversos fatores que promovem o desenvolvimento de melanomas, como a proliferação, migração celular e crescimento independente de ancoragem. Uma vez que melanoma maligno representa o tipo mais letal de câncer de pele, e por ser uma neoplasia resistente a quimioterapia e radioterapia, é importante expandir esse projeto de pesquisa, para a avaliação de mais três tipos de linhagens de melanoma humano (SK-Mel-17, SK-Mel-28 e WM35), aprofundando os ensaios nas células transfectadas com PTX3, investigando modificações nas fases do ciclo celular (sub-

G0, G0/G1, S, G2/M), e também genes da via PI3K-AKT e MAPK1 e ciclo celular (BCL2, BAX, CCND1, MYC), cujos iniciadores para PCR em tempo real já foram desenhados e alguns já foram otimizados (APÊNDICE 5). Assim será possível montar um painel mais elucidativo da ação PTX3 sobre os melanomas.

7. Resumo dos resultados

Com os dados gerados a partir destes estudos esperamos contribuir para a caracterização da ação de PTX3 no processo tumorigênico de melanomas uma vez que mostramos alguns dos mecanismos pelo qual PTX3 age, inibindo importantes do câncer para a progressão de melanoma. Estamos certos de que um maior aprofundamento dos estudos precisa ser feito, para que assim, possamos fundamentar ou não seu emprego como possível alvo farmacológico ou como agente antitumoral para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas antitumorais multimodais de melanoma, como também avaliar o potencial de PTX3 como candidato a biomarcador a ser usado no diagnóstico de melanomas, seu estágio e agressividade.

Assim, os resultados mais relevantes deste trabalho estão sintetizados abaixo:

- As células de fibrossarcoma HT-1080, adenocarcinoma colorretal HCT-116 e melanoma maligno SK-Mel-37 e SK-Mel-188 expressam os genes de FGF2 e PTX3 de forma constitutiva, com diferentes níveis de expressão entre si, sendo os níveis dos transcritos de PTX3 mais elevados em HT-1080.
- Embora o tratamento com a proteína PTX3 recombinante humana (rhPTX3) não iniba a proliferação e nem a migração das células HT-1080, o tratamento modulou negativamente a expressão de PTX3 e VEGFA nestas células.
- A rhPTX3 inibiu a expressão dos genes FGFR4 e TNFA em HCT-116.
- PTX3 inibe a proliferação celular das células de melanoma (SK-Mel-37 e SK-Mel-188), a taxa de migração celular (SK-Mel-188) e a capacidade de crescimento independente de ancoragem (SK-Mel-37 e SK-Mel-188).
- O tratamento com a rhPTX3 por 3 horas modula negativamente a expressão do gene FGF2 e positivamente a expressão dos genes FGFR4 e FGFBP na linhagem de melanoma fase precoce amelanocítico SK-Mel-37 bem como do micro-RNA miR-188,

- O perfil de expressão dos genes da FGF2, FGFBP e FGFR4 no melanoma melanocítico de fase tardia SK-Mel-188, não foi alterado pelo tratamento com PTX3, mas foi observado uma alteração do perfil de expressão do microRNA miR-149 nesta linhagem.
- O miR-199a-3p é expresso constitutivamente no melanoma de fase precoce SK-Mel-37 e não é expresso no melanoma de fase tardia SK-Mel-188.
- PTX3 inibe o crescimento de melanomas induzido pela inoculação das células SK-Mel-37 *in vivo*.

Na figura 34 é apresentado um esquema sobre as possíveis consequências da modulação da expressão de genes envolvidas com a progressão do melanoma promovida por PTX3.

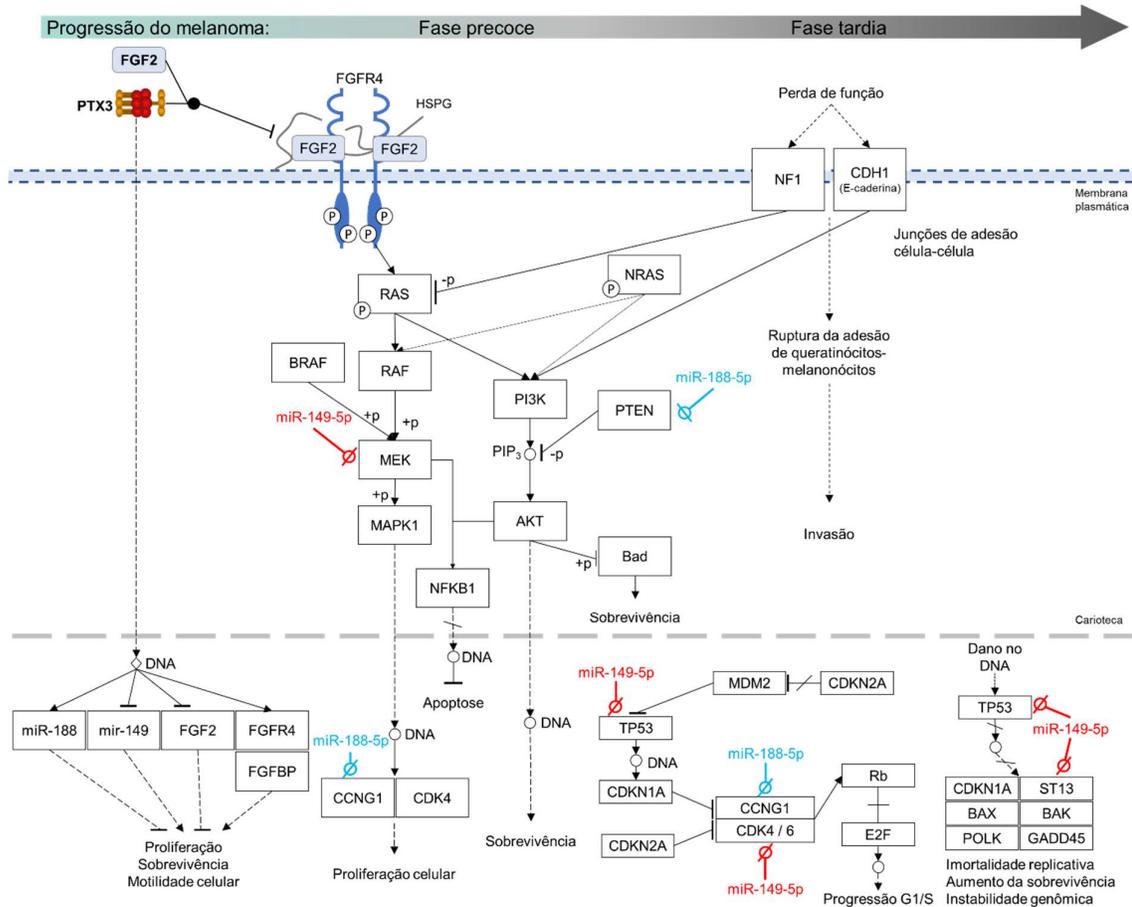


Figura 37. Representação proposta do envolvimento de PTX3 nas vias de sinalização relacionadas a progressão do melanoma.

O desenvolvimento e expansão dos melanomas são processos controlados por diferentes vias de sinalização. O principal mecanismo proposto atualmente pelo qual PTX3 afetaria a progressão dos melanomas seria através da interação proteína:proteína com FGF2 que impediria o engajamento do ligante ao seu receptor, impedindo a ativação do FGFR4. Entretanto, propomos que a modulação da expressão gênica de FGF2, FGFR4 e FGFBP por PTX3, poderia explicar uma possível modulação das vias de sinalização MAPK (RAF-MEK-MAPK1) e PI3K-AKT. Adicionalmente, a modulação positiva do miR-188 (em azul) por PTX3 pode ser um fator inibitório de CCNG1 (Ciclina-G1) nas células de melanoma. A possível modulação negativa do miR-149 oncogênico (em vermelho) também pode provocar um aumento nos níveis dos genes supressores de tumor, como TP53 e ST13 (p48). → – ativação; | – inibição; / - via *downstream* conhecida; Ø – degradação; © – fosforilado; -p desfosforilação; +p fosforilação. Para elaboração dessa ilustração original, foram utilizadas as ferramentas: iBioGuide Advaita, PCViz; mirdb.org; e targetscan.org.

8. Conclusão

PTX3 inibe a proliferação, migração celular e crescimento independente de ancoragem *in vitro* e progressão tumoral *in vivo* de melanomas. Os mecanismos adjacentes a este efeito biológico podem estar relacionados tanto à inibição da atividade biológica dos FGFs (por modulação negativa da expressão de FGF2 e/ou por inibição do engajamento de FGF2 aos seus receptores), quanto pela modulação da expressão positiva do miR-188 e negativa miR-149 que regulam a via MAPK e ciclinas que controlam as fases do ciclo celular.

9. Perspectivas

Este trabalho aponta PTX3 como um inibidor da proliferação de células de melanomas, tanto de fase precoce, quanto de fase tardia. O estudo deve ser aprofundado visando entender os efeitos de PTX3 na tumorigênese *in vivo*. Já fomos capazes de mostrar de forma preliminar, que os tumores que super-expressam PTX3 possuem volume e peso menor, mas há necessidade de se investigar a nível tecidual e gênico o efeito de PTX3 sobre a expressão de genes pró-inflamatórios como TNFA e IL1B e de genes relacionados à angiogênese como VEGFA e FGF2, bem como avaliar a arquitetura tumoral e angiogênese por imunohistoquímica utilizando marcadores como CD31 e CD34. Devemos também analisar as modificações nas fases do ciclo celular promovidas por PTX3 e para isso empregaremos a técnica de citometria de fluxo com marcadores nucleares, como iodeto de propídio e Topro3.

A avaliação do perfil de expressão de miRNAs deve ser aprofundada, analisando tanto os miRNA diferencialmente expressos entre melanomas de diferentes estágios e agressividade, como também a alteração do perfil de expressão destes miRNA por PTX3. Para isso, poderão ser utilizadas placas TLDA (*TaqMan Low Density Arrays*) e ferramentas de bioinformática para investigar os miRNA diferencialmente expressos nos diferentes grupos e estabelecer correlações.

Além disso, já foram desenhados iniciadores específicos para avaliação por RT-PCR em tempo real, do perfil de expressão de genes envolvidos no processo de EMT (caderina epitelial CDH1 e mesenquimal CDH2), e genes que codificam proteínas de junções-gap de comunicação celular (conexina 43 - GJA1, gap junction protein alpha 1) nas linhagens SK-Mel-37 e SK-Mel-188 tratadas com PTX3 e também nas transfectadas. Esses dados poderão contribuir para um melhor entendimento do papel de PTX3 na biologia dos melanomas e na interação célula-célula.

Em colaboração com a Profa. Luciana Andrade do Departamento de Morfologia do ICB da UFMG, estamos avaliando por microscopia eletrônica de

transmissão as possíveis alterações que a expressão aumentada de PTX3 pode ter promovido na estrutura das células.

Em colaboração com a Dra. Isabela Werneck, patologista do Hospital AC Camargo, analisaremos, por imunohistoquímica, a expressão de PTX3 em amostras de tecido de pacientes. Serão analisadas amostras de aproximadamente 400 pacientes organizadas em TMAs (*tissue microarray*). Essas análises nos permitirão avaliar o potencial de PTX3 como biomarcador da progressão de melanomas e de prognóstico uma vez que são conhecidos os dados clínicos dos pacientes. Esses dados também serão importantes para avaliação de um eventual papel da pentraxina na biologia deste tipo de tumor.

10. Referências

- AGRAWAL, A. et al. Pattern recognition by pentraxins. **Adv Exp Med Biol**, v. 653, p. 98-116, 2009.
- AKMAN, L. et al. The long pentraxin-3 is a useful marker for diagnosis of ovarian torsion: An experimental rat model. **J Obstet Gynaecol**, p. 1-4, Oct 2015.
- ALESSI, P. et al. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist. **Eur Cytokine Netw**, v. 20, n. 4, p. 225-34, Dec 2009.
- ALTSCHUL, S. et al. **Basic Local Alignment Search Tool**. National Library of Medicine., 2014.
- Anchorage-Independent Cell Growth. In: SCHWAB, M. (Ed.). **Encyclopedia of Cancer**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p.173-173.
- ARGANI, H. et al. Serum Fetuin-A and Pentraxin3 in hemodialysis and renal transplant patients. **Clin Biochem**, v. 45, n. 10-11, p. 775-9, Jul 2012.
- AYDOGDU, A. et al. High plasma level of long Pentraxin 3 is associated with insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. **Gynecol Endocrinol**, v. 28, n. 9, p. 722-5, Sep 2012.
- AZZURRI, A. et al. IFN-gamma-inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in Mycobacterium tuberculosis infection. **Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p. 1-8, Jan 2005.
- BAI, R. et al. ST13, a proliferation regulator, inhibits growth and migration of colorectal cancer cell lines. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 13, n. 11, p. 884-93, Nov 2012.
- BALHARA, J. et al. Pentraxin 3: an immuno-regulator in the lungs. **Front Immunol**, v. 4, p. 127, 2013.
- BARTEL, B. MicroRNAs directing siRNA biogenesis. **Nat Struct Mol Biol**, v. 12, n. 7, p. 569-71, Jul 2005.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-33, Jan 23 2009.
- BASILE, A. et al. Pentraxin 3 (PTX3) inhibits plasma cell/stromal cell cross-talk in the bone marrow of multiple myeloma patients. **J Pathol**, v. 229, n. 1, p. 87-98, Jan 2013.
- BAYER-GARNER, I. B.; HOUGH, A. J., JR.; SMOLLER, B. R. Vascular endothelial growth factor expression in malignant melanoma: prognostic versus diagnostic usefulness. **Mod Pathol**, v. 12, n. 8, p. 770-4, Aug 1999.
- BEENKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 3, p. 235-53, Mar 2009.
- BJARNADÓTTIR, T. K. et al. The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. **Genomics**, v. 84, n. 1, p. 23-33, Jul 2004.

BOTTAZZI, B. et al. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 157-83, 2010. ISSN 1545-3278.

_____. The pentraxins PTX3 and SAP in innate immunity, regulation of inflammation and tissue remodelling. **J Hepatol**, v. 64, n. 6, p. 1416-27, Jun 2016.

_____. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem**, v. 272, n. 52, p. 32817-23, Dec 1997.

BREVIARIO, F. et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem**, v. 267, n. 31, p. 22190-7, Nov 1992. ISSN 0021-9258.

BROSE, M. S. et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. **Cancer Res**, v. 62, n. 23, p. 6997-7000, Dec 01 2002.

BROŻYNA, A. A. et al. Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. In: (Ed.). **Oncotarget**, v.7, 2016. p.17844-53.

BRUCE, J. P. et al. Identification of a microRNA signature associated with risk of distant metastasis in nasopharyngeal carcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 4537-50, Feb 2015.

BRUZEK, A. K. et al. Molecular characterization reveals NF1 deletions and FGFR1-activating mutations in a pediatric spinal oligodendroglioma. **Pediatr Blood Cancer**, v. 64, n. 6, Jun 2017. ISSN 1545-5017.

BUOLAMWINI, J. K. Novel anticancer drug discovery. **Curr Opin Chem Biol**, v. 3, n. 4, p. 500-9, Aug 1999.

BURKE, D. et al. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. **Trends Biochem Sci**, v. 23, n. 2, p. 59-62, Feb 1998.

CALIN, G. A. et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 9, p. 2999-3004, Mar 2004. ISSN 0027-8424.

CAREY, T. E. et al. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 73, n. 9, p. 3278-82, Sep 1976.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249-257, 09/14/print 2000.

_____. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 6, p. 417-27, Jun 2011.

CASAS, J. P. et al. C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. **J Intern Med**, v. 264, n. 4, p. 295-314, Oct 2008.

CHANG, S. H.; HLA, T. Post-transcriptional gene regulation by HuR and microRNAs in angiogenesis. **Curr Opin Hematol**, v. 21, n. 3, p. 235-40, May 2014.

CHOI, B. et al. Elevated Pentraxin 3 in bone metastatic breast cancer is correlated with osteolytic function. **Oncotarget**, v. 5, n. 2, p. 481-92, Jan 2014.

CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P. A.; ADAMS, A. E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **J Clin Invest**, v. 115, n. 4, p. 813-24, Apr 2005.

CONSORTIUM, A. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. **Nat Genet**, v. 26, n. 3, p. 345-8, Nov 2000.

CROCE, C. M. Oncogenes and Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 5, p. 502-511, 2008.

DAIGO, K.; HAMAKUBO, T. Host-protective effect of circulating pentraxin 3 (PTX3) and complex formation with neutrophil extracellular traps. **Front Immunol**, v. 3, p. 378, 2012.

DAIGO, K. et al. Pentraxins in the activation and regulation of innate immunity. **Immunol Rev**, v. 274, n. 1, p. 202-217, Nov 2016.

DANIELE, G. et al. FGF receptor inhibitors: role in cancer therapy. **Curr Oncol Rep**, v. 14, n. 2, p. 111-9, Apr 2012.

DAY, D. A.; TUIITE, M. F. Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. **J Endocrinol**, v. 157, n. 3, p. 361-71, Jun 1998.

DE ARAÚJO JUNQUEIRA, A. F. et al. Adenosine deaminase inhibition prevents Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in mice. **Infect Immun**, v. 79, n. 2, p. 653-62, Feb 2011.

DEBAN, L. et al. Pentraxins: multifunctional proteins at the interface of innate immunity and inflammation. **Biofactors**, v. 35, n. 2, p. 138-45, 2009 Mar-Apr 2009.

_____. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. **Cell Tissue Res**, v. 343, n. 1, p. 237-49, Jan 2011.

_____. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. **Nat Immunol**, v. 11, n. 4, p. 328-34, Apr 2010.

DEWITT, N. Angiogenesis. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 931-931, 12/15/print 2005.

DIAMANDIS, E. P. et al. Pentraxin-3 is a novel biomarker of lung carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 17, n. 8, p. 2395-9, Apr 2011. ISSN 1078-0432.

DIAS, A. A. et al. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 6, p. 928-36, Jun 2001.

DICK, F. A.; RUBIN, S. M. Molecular mechanisms underlying RB protein function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 5, p. 297-306, May 2013.

DINIZ, S. N. et al. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 4, p. 649-56, Apr 2004.

DONG, J. et al. BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. **Cancer Res**, v. 63, n. 14, p. 3883-5, Jul 15 2003.

DONI, A. et al. Cell-specific regulation of PTX3 by glucocorticoid hormones in hematopoietic and nonhematopoietic cells. **J Biol Chem**, v. 283, n. 44, p. 29983-92, Oct 2008.

_____. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 4, p. 797-802, Apr 2006.

DONIA, M.; KJELDSEN, J. W.; SVANE, I. M. The controversial role of TNF in melanoma. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 4, p. e1107699, Apr 2016.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 61, n. 3, p. 377-92, Sep 1997.

DU CLOS, T. W. Pentraxins: structure, function, and role in inflammation. **ISRN Inflamm**, v. 2013, p. 379040, Sep 2013.

FACKLER, O. T.; GROSSE, R. Cell motility through plasma membrane blebbing. **J Cell Biol**, v. 181, n. 6, p. 879-84, Jun 2008.

FERRERO, L.; CAMERON, B.; CROUZET, J. Analysis of gyrA and grlA mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of Staphylococcus aureus. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 7, p. 1554-8, Jul 1995.

FOO, S. S. et al. Role of pentraxin 3 in shaping arthritogenic alphaviral disease: from enhanced viral replication to immunomodulation. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 2, p. e1004649, Feb 2015.

_____. Pentraxins and Collectins: Friend or Foe during Pathogen Invasion? **Trends Microbiol**, v. 23, n. 12, p. 799-811, Dec 2015.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362-74, May 2003.

GARLANDA, C. et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 337-66, 2005.

_____. Pentraxins in innate immunity and inflammation. **Novartis Found Symp**, v. 279, p. 80-6; discussion 86-91, 216-9, 2006.

_____. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 182-6, Nov 2002.

_____. PTX3, a humoral pattern recognition molecule at the interface between microbe and matrix recognition. **Curr Opin Immunol**, v. 38, p. 39-44, Feb 2016.

GARZON, R.; MARCUCCI, G.; CROCE, C. M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 10, p. 775-89, Oct 2010.

GEWURZ, H.; ZHANG, X. H.; LINT, T. F. Structure and function of the pentraxins. In: (Ed.). **Curr Opin Immunol**. England, v.7, 1995. p.54-64.

GIACOMINI, A. et al. A long pentraxin-3-derived pentapeptide for the therapy of FGF8b-driven steroid hormone-regulated cancers. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 13790-802, May 2015.

GIANCOTTI, A. et al. Pfeiffer syndrome: literature review of prenatal sonographic findings and genetic diagnosis. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 30, n. 18, p. 2225-2231, Sep 2017.

GILGÈS, D. et al. Polydom: a secreted protein with pentraxin, complement control protein, epidermal growth factor and von Willebrand factor A domains. **Biochem J**, v. 352 Pt 1, p. 49-59, Nov 2000.

GOETZ, R.; MOHAMMADI, M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 3, p. 166-80, Mar 2013.

GOODMAN, A. R. et al. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 7, n. 2, p. 191-202, Aug 1996.

GOULD, J. M.; WEISER, J. N. Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. **Infect Immun**, v. 69, n. 3, p. 1747-54, Mar 2001.

GOYDOS, J. S. et al. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. **J Am Coll Surg**, v. 200, n. 3, p. 362-70, Mar 2005.

GRAEVEN, U. et al. Modulation of angiogenesis and tumorigenicity of human melanocytic cells by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. **Cancer Res**, v. 61, n. 19, p. 7282-90, Oct 01 2001.

HAN, B. et al. Protective effects of long pentraxin PTX3 on lung injury in a severe acute respiratory syndrome model in mice. **Lab Invest**, v. 92, n. 9, p. 1285-96, Sep 2012.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 1/7/2000.

_____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172.

HARDELIN, J. P.; DODE, C. The complex genetics of Kallmann syndrome: KAL1, FGFR1, FGF8, PROKR2, PROK2, et al. **Sex Dev**, v. 2, n. 4-5, p. 181-93, 2008.

HARMER, N. J. et al. Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex. **J Mol Biol**, v. 339, n. 4, p. 821-34, Jun 11 2004.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007.

HENNESSY, B. T. et al. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 12, p. 988-1004, Dec 2005.

HILL, A. L. et al. Regulation of pentraxin-3 by antioxidants. **Br J Anaesth**, v. 103, n. 6, p. 833-9, Dec 2009.

HUTTUNEN, R. et al. High plasma level of long pentraxin 3 (PTX3) is associated with fatal disease in bacteremic patients: a prospective cohort study. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17653, 2011.

IACUC. Guidelines for tumor production in rats and mice. 2009.

INFORZATO, A. et al. The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2. **J Biol Chem**, v. 285, n. 23, p. 17681-92, Jun 2010.

_____. Pentraxins in humoral innate immunity. **Adv Exp Med Biol**, v. 946, p. 1-20, 2012.

_____. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. **Biochemistry**, v. 45, n. 38, p. 11540-51, Sep 2006.

_____. The "sweet" side of a long pentraxin: how glycosylation affects PTX3 functions in innate immunity and inflammation. **Front Immunol**, v. 3, p. 407, 2012.

JABS, W. J. et al. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 1, p. 152-61, Jan 2003.

JAILLON, S. et al. Prototypic Long Pentraxin PTX3 Is Present in Breast Milk, Spreads in Tissues, and Protects Neonate Mice from *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. **J Immunol**, v. 191, n. 4, p. 1873-82, Aug 2013.

_____. The humoral pattern recognition molecule PTX3 is a key component of innate immunity against urinary tract infection. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 621-32, Apr 2014.

JIN, L. et al. MicroRNA-149*, a p53-responsive microRNA, functions as an oncogenic regulator in human melanoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 15840-15845, September 20, 2011 2011.

JOB, E. R. et al. Pandemic H1N1 influenza A viruses are resistant to the antiviral activities of innate immune proteins of the collectin and pentraxin superfamilies. **J Immunol**, v. 185, n. 7, p. 4284-91, Oct 2010.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1420-8, Jun 2009.

KIBBI, N.; KLUGER, H.; CHOI, J. N. Melanoma: Clinical Presentations. **Cancer Treat Res**, v. 167, p. 107-29, 2016.

KIM, M. P.; ZHANG, Y.; LOZANO, G. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. **Front Oncol**, v. 5, p. 249, 2015.

KOBAYASHI, H.; LIN, P. C. Angiogenesis links chronic inflammation with cancer. **Methods Mol Biol**, v. 511, p. 185-91, 2009.

KONDO, S. et al. Clinical impact of pentraxin family expression on prognosis of pancreatic carcinoma. **Br J Cancer**, v. 109, n. 3, p. 739-46, Aug 2013.

KUME, N. et al. Pentraxin 3 as a biomarker for acute coronary syndrome: comparison with biomarkers for cardiac damage. **J Cardiol**, v. 58, n. 1, p. 38-45, Jul 2011.

KUSNIERZ-CABALA, B. et al. Plasma pentraxin 3 concentrations in patients with acute pancreatitis. **Clin Lab**, v. 59, n. 9-10, p. 1003-8, 2013.

LAIRD, P. W. et al. Simplified mammalian DNA isolation procedure. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 15, p. 4293, Aug 1991.

- LANDRISCINA, M. et al. S100A13 participates in the release of fibroblast growth factor 1 in response to heat shock in vitro. **J Biol Chem**, v. 276, n. 25, p. 22544-52, Jun 2001.
- LEALI, D. et al. Long pentraxin-3 inhibits FGF8b-dependent angiogenesis and growth of steroid hormone-regulated tumors. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 9, p. 1600-10, Sep 2011.
- _____. Fibroblast growth factor-2 antagonist and antiangiogenic activity of long-pentraxin 3-derived synthetic peptides. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 30, p. 3577-89, 2009.
- _____. Fibroblast growth factor 2-antagonist activity of a long-pentraxin 3-derived antiangiogenic pentapeptide. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 8, p. 2109-21, Aug 2010.
- LEE, G. W.; LEE, T. H.; VILCEK, J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. **J Immunol**, v. 150, n. 5, p. 1804-12, Mar 1993.
- LEE, T. H. et al. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 1982-8, May 1990.
- LIEU, C. et al. Beyond VEGF: Inhibition of the Fibroblast Growth Factor Pathway and Antiangiogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 19, p. 6130-6139, 2011.
- LIU, Y.; SHEIKH, M. S. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. **Mol Cell Pharmacol**, v. 6, n. 3, p. 228, 2014.
- LOCATELLI, M. et al. The long pentraxin PTX3 as a correlate of cancer-related inflammation and prognosis of malignancy in gliomas. **J Neuroimmunol**, v. 260, n. 1-2, p. 99-106, Jul 2013.
- LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 7. Artmed, 2014.
- LUCA, M. et al. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. **Am J Pathol**, v. 151, n. 4, p. 1105-13, Oct 1997.
- MA, Y. J. et al. Synergy between ficolin-2 and pentraxin 3 boosts innate immune recognition and complement deposition. **J Biol Chem**, v. 284, n. 41, p. 28263-75, Oct 2009.
- _____. Heterocomplexes of mannose-binding lectin and the pentraxins PTX3 or serum amyloid P component trigger cross-activation of the complement system. **J Biol Chem**, v. 286, n. 5, p. 3405-17, Feb 2011.
- MAIRUHU, A. T. et al. Elevated plasma levels of the long pentraxin, pentraxin 3, in severe dengue virus infections. **J Med Virol**, v. 76, n. 4, p. 547-52, Aug 2005.
- MALIK, S. T. et al. Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. **Eur J Cancer**, v. 26, n. 10, p. 1031-4, 1990.
- MANTHEY, J. A. **mFold, Delta G, and Melting Temperature: What Does it Mean?** Integrated DNA Technologies 2005.
- MANTOVANI, A.; GARLANDA, C.; BOTTAZZI, B. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. **Vaccine**, v. 21 Suppl 2, p. S43-7, Jun 2003.

MANTOVANI, A. et al. The long pentraxin PTX3: a paradigm for humoral pattern recognition molecules. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1285, p. 1-14, May 2013.

MARTINEZ DE LA TORRE, Y. et al. Evolution of the pentraxin family: the new entry PTX4. **J Immunol**, v. 184, n. 9, p. 5055-64, May 2010.

MCDONALD, S. L. et al. Expression analysis of genes identified by molecular profiling of VGP melanomas and MGP melanoma-positive lymph nodes. **Cancer Biol Ther**, v. 3, n. 1, p. 110-20, Jan 2004.

MELO, S. A.; ESTELLER, M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. **FEBS Lett**, v. 585, n. 13, p. 2087-99, Jul 2011.

MERYK, P. et al. [Diagnostic importance of pentraxins at the early phase of acute pancreatitis]. **Przeegl Lek**, v. 71, n. 6, p. 309-13, 2014.

MIHLAN, M. et al. Monomeric CRP contributes to complement control in fluid phase and on cellular surfaces and increases phagocytosis by recruiting factor H. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 12, p. 1630-40, Dec 2009.

MOALLI, F. et al. Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 830421, 2011.

_____. The therapeutic potential of the humoral pattern recognition molecule PTX3 in chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Immunol**, v. 186, n. 9, p. 5425-34, May 2011.

MORGENSTERN, J. P.; LAND, H. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. **Nucleic Acids Res**, v. 18, n. 12, p. 3587-96, Jun 1990.

MORI, S. et al. An Anchorage-Independent Cell Growth Signature Identifies Tumors with Metastatic Potential. **Oncogene**, v. 28, n. 31, p. 2796-805, Aug 6 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

N., H. A. et al. Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 165, n. 3, p. 812-29, 1987.

NAUTA, A. J. et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 2, p. 465-73, Feb 2003.

NG, P. M. et al. C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. **Embo j**, v. 26, n. 14, p. 3431-40, Jul 25 2007.

NISSEN, L. J. et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. **J Clin Invest**, v. 117, n. 10, p. 2766-77, Oct 2007.

NUNES, J. **Avaliação do efeito biológico da pentraxina 3 em linhagens de células tumorais humanas** 2014. 100 (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Biblioteca Digital da UFMG.

- NUNES, J. P. S.; DIAS, A. A. ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar and wound-healing assays. **Biotechniques**, v. 62, n. 4, p. 175-179, Apr 2017.
- OKEMEFUNA, A. I. et al. Complement factor H binds at two independent sites to C-reactive protein in acute phase concentrations. **J Biol Chem**, v. 285, n. 2, p. 1053-65, Jan 8 2010.
- OLIVEIRA, F. I. S. D. et al. **Caracterização da expressão da Pentraxina 3 em células epiteliais intestinais humanas tratadas com toxina A de Clostridium difficile**. 2017. 68 (Trabalho de conclusão de curso de graduação). Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- OLSEN, S. K. et al. Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs. **J Biol Chem**, v. 278, n. 36, p. 34226-36, Sep 5 2003.
- ORI, A.; WILKINSON, M. C.; FERNIG, D. G. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. **Front Biosci**, v. 13, p. 4309-38, 2008.
- ORNITZ, D. M. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. **Bioessays**, v. 22, n. 2, p. 108-12, Feb 2000.
- ORNITZ, D. M.; ITOH, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 4, n. 3, p. 215-66, May 2015.
- ORNITZ, D. M.; LEGEAI-MALLET, L. Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. **Dev Dyn**, v. 246, n. 4, p. 291-309, Apr 2017.
- ORNITZ, D. M. et al. Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 25, p. 15292-15297, 1996.
- OZAKI, K.; MORISHITA, R.; OGIHARA, T. [Overview on diagnosis, treatment and therapeutic angiogenesis for arteriosclerosis obliterans]. **Nihon Rinsho**, v. 64, n. 11, p. 2045-51, Nov 2006.
- PARTANEN, J. I.; NIEMINEN, A. I.; KLEFSTROM, J. 3D view to tumor suppression: Lkb1, polarity and the arrest of oncogenic c-Myc. **Cell Cycle**, v. 8, n. 5, p. 716-24, Mar 2009.
- PENCHEVA, N. et al. Convergent multi-miRNA targeting of ApoE drives LRP1/LRP8-dependent melanoma metastasis and angiogenesis. **Cell**, v. 151, n. 5, p. 1068-82, Nov 2012.
- PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **J Clin Invest**, v. 111, n. 12, p. 1805-12, Jun 2003.
- PERI, G. et al. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. **Circulation**, v. 102, n. 6, p. 636-41, Aug 2000.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.
- PISAPIA, L. et al. EBP1 protein modulates the expression of human MHC class II molecules in non-hematopoietic cancer cells. **Int J Oncol**, v. 47, n. 2, p. 481-9, Aug 2015.
- POPIVANOVA, B. K. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. In: (Ed.), v.118, 2008. p.560-70.

- PRAGER, G. W. et al. Angiogenesis in cancer: Anti-VEGF escape mechanisms. **Translational Lung Cancer Research**, v. 1, n. 1, p. 14-25, 2012.
- PRESTA, M. et al. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. **J Cell Mol Med**, v. 11, n. 4, p. 723-38, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 1582-1838.
- _____. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 159-78, Apr 2005.
- PRUDOVSKY, I. et al. The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 24, p. 4871-81, Dec 2003.
- QI, L. et al. FGF4 induces epithelial-mesenchymal transition by inducing store-operated calcium entry in lung adenocarcinoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 45, p. 74015-74030, Nov 2016.
- QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, v. 19, n. 11, p. 1423-37, Nov 2013.
- RASBAND, W. S. **ImageJ**. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA 1997-2015.
- REAL, J. M. et al. Pentraxin 3 accelerates lung injury in high tidal volume ventilation in mice. **Mol Immunol**, v. 51, n. 1, p. 82-90, May 2012.
- REDDY, K. B. MicroRNA (miRNA) in cancer. In: (Ed.). **Cancer Cell Int**. London, v.15, 2015.
- RIBATTI, D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 1, p. 3-10, 2008/03/01 2008.
- RONCA, R. et al. Long pentraxin-3 as an epithelial-stromal fibroblast growth factor-targeting inhibitor in prostate cancer. **J Pathol**, v. 230, n. 2, p. 228-38, Jun 2013.
- _____. Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 12, p. 2760-71, Dec 2013.
- ROUMENINA, L. T. et al. Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains. **Biochemistry**, v. 45, n. 13, p. 4093-104, Apr 2006.
- RUBINO, M. et al. Epigenetic regulation of the extrinsic oncosuppressor PTX3 gene in inflammation and cancer. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 7, p. e1333215, 2017.
- RUSNATI, M. et al. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. **Blood**, v. 104, n. 1, p. 92-9, Jul 2004.
- SAHAI, E. Mechanisms of cancer cell invasion. **Curr Opin Genet Dev**, v. 15, n. 1, p. 87-96, Feb 2005.
- SAHAI, E.; MARSHALL, C. J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. **Nat Cell Biol**, v. 5, n. 8, p. 711-9, Aug 2003.
- SALIO, M. et al. Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 117, n. 8, p. 1055-64, Feb 2008.

SALUSTRI, A. et al. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1577-86, Apr 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Preparation and Transformation of Competent E. coli Using Calcium Chloride. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 1, p. pdb.prot3932, June 1, 2006 2006.

SCARCHILLI, L. et al. PTX3 interacts with inter-alpha-trypsin inhibitor: implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion. **J Biol Chem**, v. 282, n. 41, p. 30161-70, Oct 2007.

SEGHEZZI, G. et al. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. **J Cell Biol**, v. 141, n. 7, p. 1659-73, Jun 29 1998.

SERRAO, E.; ENGELMAN, A. N. Sites of retroviral DNA integration: From basic research to clinical applications. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 51, n. 1, p. 26-42, 2016.

SHARFMAN, W. H. **Melanoma**. United States of America: Demos Medical Publishing LLC, 2012.

SHATSEVA, T. et al. MicroRNA miR-199a-3p regulates cell proliferation and survival by targeting caveolin-2. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 16, p. 2826-36, Aug 2011.

SHI, H. et al. The oncoprotein HBXIP up-regulates FGF4 through activating transcriptional factor Sp1 to promote the migration of breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 471, n. 1, p. 89-94, Feb 2016.

SJÖBERG, B. et al. Association between levels of pentraxin 3 and incidence of chronic kidney disease in the elderly. **J Intern Med**, v. 279, n. 2, p. 173-9, Feb 2016.

SOARES, A. C. et al. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. **Microbes Infect**, v. 8, n. 5, p. 1321-9, Apr 2006.

SOUZA, D. G. et al. The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. **Am J Pathol**, v. 174, n. 4, p. 1309-18, Apr 2009.

STAHL, J. M. et al. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. **Cancer Res**, v. 63, n. 11, p. 2881-90, Jun 2003.

TADA, H. et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunol Methods**, v. 93, n. 2, p. 157-65, Nov 6 1986.

TANIO, M.; WAKAMATSU, K.; KOHNO, T. Binding site of C-reactive protein on M-ficolin. **Mol Immunol**, v. 47, n. 2-3, p. 215-21, Dec 2009.

TASSI, E.; WELLSTEIN, A. Tumor angiogenesis: initiation and targeting - therapeutic targeting of an FGF-binding protein, an angiogenic switch molecule, and indicator of early stages of gastrointestinal adenocarcinomas -. **Cancer Res Treat**, v. 38, n. 4, p. 189-97, Dec 2006.

- TEKIN, M. et al. Homozygous FGF3 mutations result in congenital deafness with inner ear agenesis, microtia, and microdontia. **Clin Genet**, v. 73, n. 6, p. 554-65, Jun 2008.
- THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 8, p. 581-93, Aug 2009.
- TOSI, F. et al. Plasma levels of pentraxin-3, an inflammatory protein involved in fertility, are reduced in women with polycystic ovary syndrome. **Eur J Endocrinol**, v. 170, n. 3, p. 401-9, Mar 2014.
- TSUNODA, S. et al. Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization. **Cancer Sci**, v. 98, n. 4, p. 541-8, Apr 2007.
- TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116-29, Feb 2010.
- USTUNDAG, M. et al. Comparative diagnostic accuracy of serum levels of neutrophil activating peptide-2 and pentraxin-3 versus troponin-I in acute coronary syndrome. **Anadolu Kardiyol Derg**, v. 11, n. 7, p. 588-94, Nov 2011.
- VERWEIJ, J.; PINEDO, H. M. Mitomycin C: mechanism of action, usefulness and limitations. **Anticancer Drugs**, v. 1, n. 1, p. 5-13, Oct 1990.
- VILAHUR, G.; BADIMON, L. Biological actions of pentraxins. **Vascul Pharmacol**, v. 73, p. 38-44, Oct 2015.
- WANG, J. G. et al. Disorders in angiogenesis and redox pathways are main factors contributing to the progression of rheumatoid arthritis: a comparative proteomics study. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 4, p. 993-1004, Apr 2012.
- WESCHE, J. et al. FGF-1 and FGF-2 require the cytosolic chaperone Hsp90 for translocation into the cytosol and the cell nucleus. **J Biol Chem**, v. 281, n. 16, p. 11405-12, Apr 2006.
- WU, J. et al. MicroRNA-188 suppresses G1/S transition by targeting multiple cyclin/CDK complexes. **Cell Commun Signal**, v. 12, p. 66, Oct 11 2014.
- YAMAMOTO, T. Angiogenic and inflammatory properties of psoriatic arthritis. **ISRN Dermatol**, v. 2013, p. 630620, 2013.
- YANG, X. et al. MicroRNA-199a-5p inhibits tumor proliferation in melanoma by mediating HIF-1 α . **Mol Med Rep**, v. 13, n. 6, p. 5241-7, Jun 2016.
- YING, T. H. et al. Knockdown of Pentraxin 3 suppresses tumorigenicity and metastasis of human cervical cancer cells. **Sci Rep**, v. 6, p. 29385, Jul 2016.
- YOSHIDA, A. et al. Intraocular neovascularization. **Histol Histopathol**, v. 14, n. 4, p. 1287-94, Oct 1999.
- YOUNG, L. et al. Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nat Protoc**, v. 5, n. 5, p. 929-34, May 2010.

ZHANG, L. et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 24, p. 9136-41, Jun 13 2006.

ZHENG, X. et al. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. **Biotechnol Prog**, v. 22, n. 5, p. 1294-300, Sep-Oct 2006.

ZICHE, M.; DONNINI, S.; MORBIDELLI, L. Development of new drugs in angiogenesis. **Curr Drug Targets**, v. 5, n. 5, p. 485-93, Jul 2004.

ZINS, K. et al. Colon Cancer Cell-Derived Tumor Necrosis Factor- α Mediates the Tumor Growth-Promoting Response in Macrophages by Up-regulating the Colony-Stimulating Factor-1 Pathway. **Cancer Research**, v. 67, n. 3, p. 1038-1045, 2007.

ANEXOS

ANEXO I. Aprovação pelo comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do papel biológico de PTX3 na progressão tumoral em modelo murino", protocolo do CEUA: 352/2016 sob a responsabilidade de Adriana Abalen Martins Dias que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 14/03/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	20/01/2017 a 20/01/2019
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C Nude
Nº de animais	12
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	12
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério central da UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C
Nº de animais	12
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C Nude
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C Nude
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)

Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57BL/6
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	6
Peso/Idade	20g / 6(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério

Considerações posteriores:

14/03/2017	Aprovado na reunião do dia 13/03/2017.
------------	--

Belo Horizonte, 25/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO II. Estrutura do *backbone* de pBABE/Puro

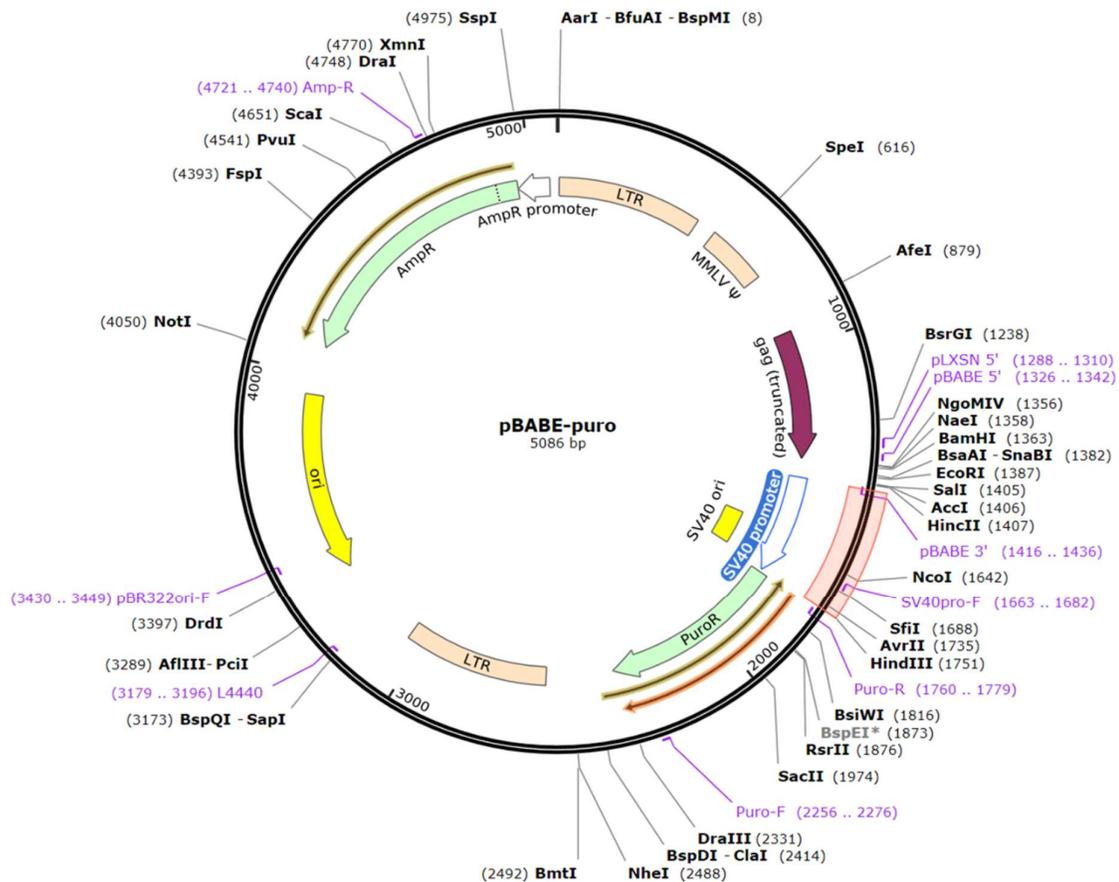


Figura 38. Estrutura do *backbone* do plasmídeo pBABE_mock

O plasmídeo pBABE_mock é derivado do retrovírus de leucemia murina Moloney. Este vetor foi doado pelo pesquisador Dr. Roberto Ronca e a estrutura nucleotídica é composto por dois LTRs (5' e 3'), genes de resistência a puomicina e ampicilina e possui vários sítios de reconhecimento de enzimas de restrição. O cDNA completo de PTX3 humano foi inserido no sítio reconhecido por EcoRI.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Análise da contaminação por micoplasma das linhagens de células humanas

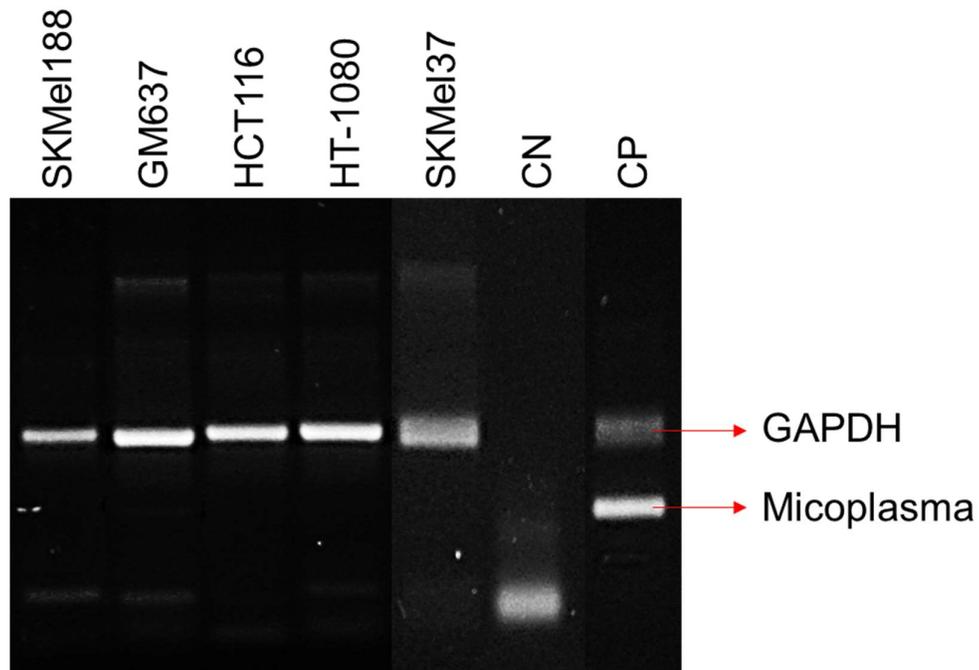


Figura 39. Análise da contaminação por micoplasma nas células humanas

As células tumorais de fibrossarcoma humano HT-1080, adenocarcinoma colorretal HCT-116, melanoma SK-Mel-37 e SK-Mel-188 e fibroblasto imortalizado GM-637 foram avaliados quanto a contaminação por micoplasma por PCR Duplex. CN: controle negativo. CP: controle positivo.

APÊNDICE 2. Curva de amplificação, curva padrão e curva de dissociação otimizadas para PTX3

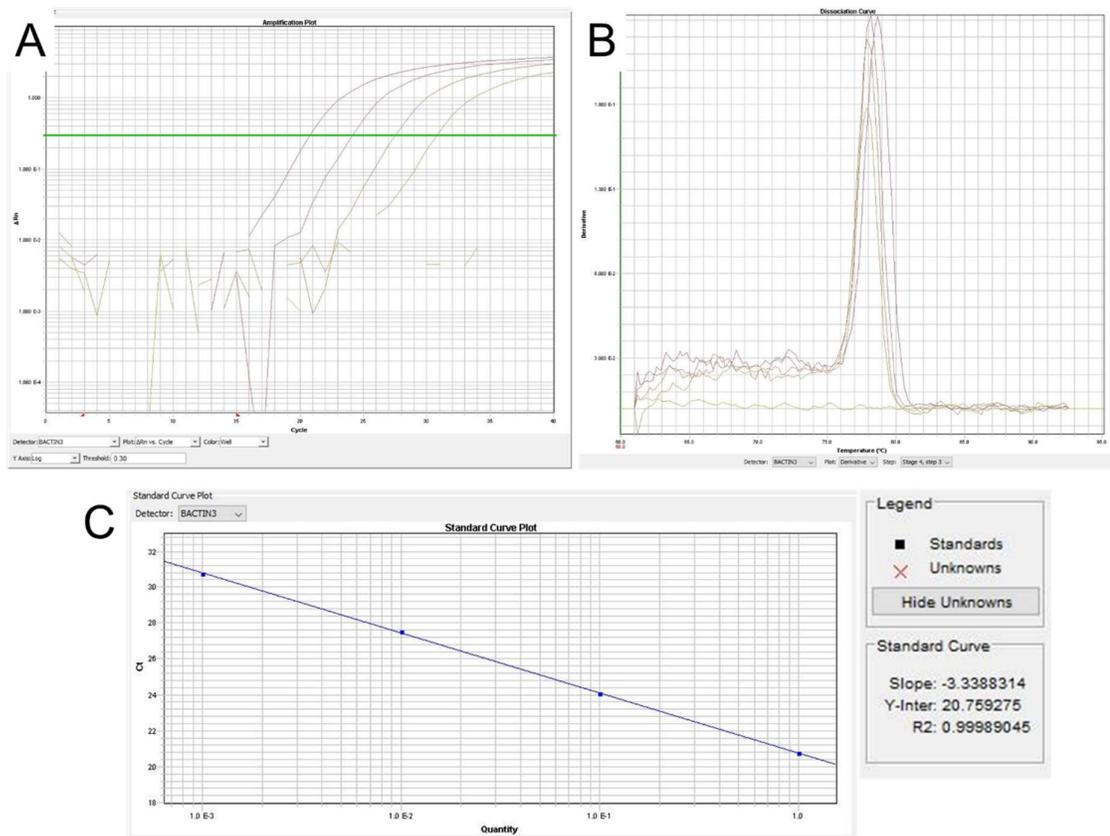


Figura 40. Condições otimizadas dos iniciadores de PTX3 para PCR em tempo real

Os iniciadores desenhados para amplificação do cDNA de PTX3 foram otimizados utilizando cDNA de RNA total extraído da linhagem de fibrossarcoma humano HT-1080. A concentração dos iniciadores de PTX3 variou de 5 a 30 pmol/ μ l e de cDNA variou de 1, 1:10, 1:100 e 1:1000. A) gráfico da curva de amplificação está plotado ΔRn (eixo Y) x ciclos (quantidade, eixo X). B) Curva de dissociação: Derivativa (eixo Y) x Temperatura ($^{\circ}C$, eixo X). C) Curva padrão: C_T (eixo Y) x Quantidade de cDNA (eixo X). Valor de *slope* indica o decaimento da curva padrão, gerando um valor de -3,33, que representa eficiência de 99,66% pela Equação 1.

APÊNDICE 3. Estruturas secundárias dos iniciadores para amplificação de PTX3 e FGF2 por PCR em tempo real

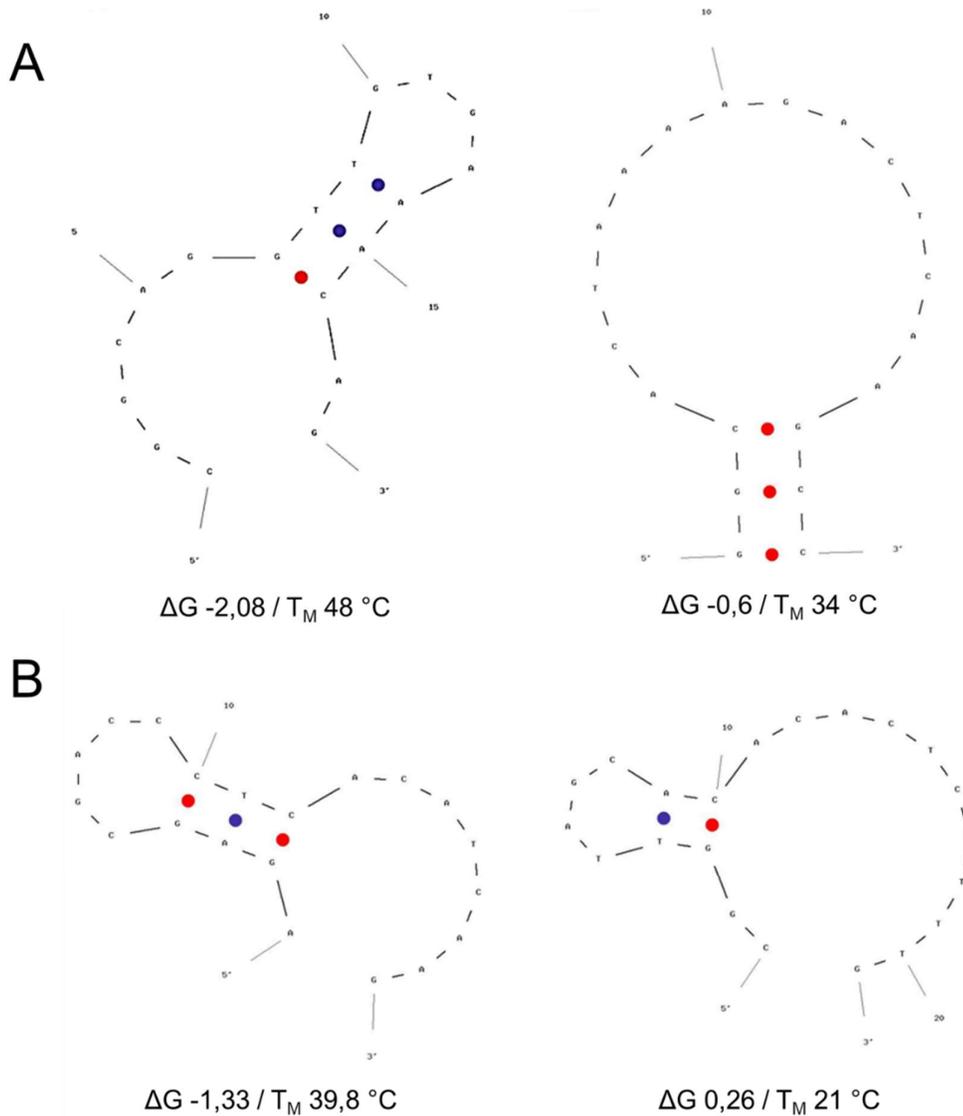


Figura 41. Estruturas secundárias (*hairpins*) possíveis de serem formadas nos iniciadores para PTX3 e FGF2.

A sequência dos iniciadores forward (esquerda) e reverse (direita) desenhados para PTX3 (A) e FGF2 (B) foram submetidos a uma análise quanto a formação de estruturas secundárias na ferramenta OligoAnalyzer (IDTDNA). Ambas indicam o ΔG mínimo estimado de cada estrutura e a T_M de formação do *hairpin*. Quanto mais próximo o valor de ΔG for de 0 e menor a T_M para formação dessas estruturas, menor é a possibilidade de acontecerem erros na PCR.

APÊNDICE 4. Bactérias transformadas com os plasmídeos pBABE/Puro mock e PTX3

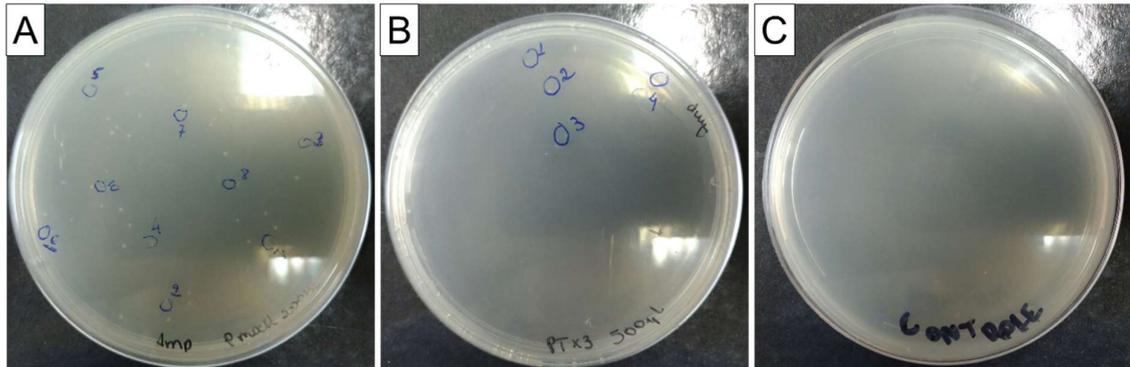


Figura 42. Clones de bactérias TOP10 transformadas com os plasmídeos pBABE_mock e pBABE_PTX3

As bactérias quimiocompetentes *Escherichia coli* TOP10 foram transformadas com 50 ng do DNA plasmidial pBABE_mock e pBABE_PTX3 utilizando o método do choque térmico (Sambrook e Russell, 2006). Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 100 x 20 mm com meio LB-agar pré-solidificado a temperatura ambiente contendo 100 µg/ml do antibiótico ampicilina. As placas foram, então, incubadas em estufa a 37 °C por 18 horas (*overnight*). Com o auxílio de uma alça de coleta calibrada em loop, foram coletadas: **A)** dez colônias de bactérias resistentes contendo pDNA pBABE_mock e **B)** todas (quatro) as colônias de bactérias contendo pBABE_PTX3. Placas contendo bactérias não transformadas foram usadas como controle negativo (**C**).

APÊNDICE 5. Iniciadores desenhados para análise da transição EMT, ciclo celular e vias MAPK e AKT

Tabela 12. Iniciadores desenhados para avaliar o efeito de PTX3 na transição epitélio-mesenquimal, ciclo celular e vias MAPK e AKT

Gene alvo	Sequência 5' – 3'
qhCHD1_Fw	ATA CAC TCT CTT CTC TCA CGC TGT
qhCHD1_Rv	AAT TCG GGC TTG TTG TCA TTC T
qhGJA1_Fw	CTT TTA AGC AAA AGA GTG GTG CC
qhGJA1_Rv	TTC CCT CCA GCA GTT GAG TAG G
qhCHD2_Fw	CTA CTT TCC TTG CTT CTG ACA ATG GAA
qhCHD2_Rv	CTT GAG GTA ACA CTT GAG GGG CA
qhBAX_Fw:	CCG AGA GGT CTT TTT CCG AG
qhBAX_Rv:	GC CTT GAG CAC CAG TTT
qhBLC2_Fw:	AGG ATA ACG GAG GCT GGG AT
qhBLC2_Rv:	CAG GGC CAA ACT GAG CAG AG
qhCCND1_Fw:	TCA AAT GTG TGC AGA AGG AGG
qhCCND1_Rv:	TCT GTT CCT CGC AGA CCT
qhMYC_Fw:	GTA GTG GAA AAC CAG CAG CC
qhMYC_Rv:	TCG TCG CAG TAG AAA TAC GG
qhCDKN1A_Fw:	GAC CTC TAA AGA CCC CAG AAA T
qhCDKN1A_Rv:	ACA CAG GAC TTT TGC CTC CT
qhFGF5_Fw	GGG GAT TGT AGG AAT ACG AGG
qhFGF5_Rv	TCA TCT GTG AAC TTG GCA CTT
qhAPI5_fw	GTT CAC CAC CCA AGA AAT C
qhAPI5_Rv	GGC TCC TCT CTG CTC ATA
qhSDC4_Fw	CGA TGA GGA TGT AGT GGG G
qhSDC4_Rv	AGG CAC CAA GGG ATG G
qhMAPK1_Fw	CGC CGA AGC ACC ATT CA
qhMAPK1_Rv	TCT GAG CCC TTG TCC TGA
qhEGF_Fw	GCG TTC CTC TTA GCC CAG TA
qhEGF_Rv	AAT GGT TGT GGT CCT GAA GC
qhAKT_Fw	AAC ACC TTC ATC ATC CGCT G
qhAKT_Rv	ACT CCT CCC GCT CCT CA

APÊNDICE 6. Curva de morte das células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 com puromicina

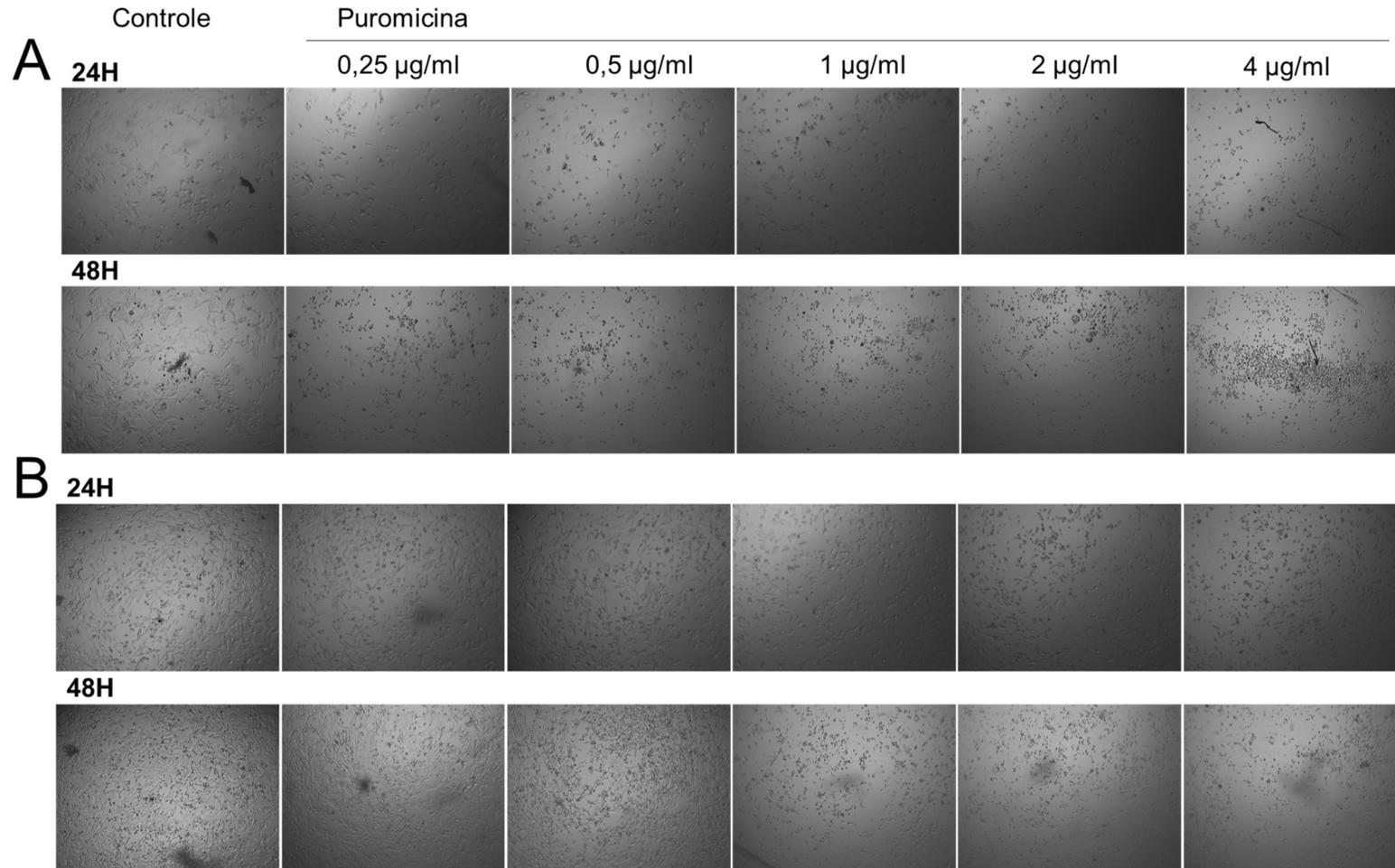


Figura 43. Análise da curva de morte das células SK-Mel-37 e SK-Mel-188 em resposta a puromicina

As células de melanoma humano foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% de FBS, 2 mM L-glutamina e concentrações variadas de puromicina (0,25 a 4 µg/ml) e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 24, 48 e 72 horas. Micrografias mostram as células **A)** SK-Mel-37 (5 x 10⁴ células / 0,95 cm²) e **B)** SK-Mel-188 (5 x 10⁴ células / 0,95 cm²) cultivadas em meio com puromicina por até 48 horas. Controle: DMEM sem puromicina.

APÊNDICE 7. miRNAs e os diferentes tipos cânceres

Tabela 13. miRNAs em diferentes tipos de câncer e funções associadas

microRNA	Tipo de câncer	Referência
miR-10a	Leucemia mielóide aguda	Zhi, Y. et al. Int J Hematol. 2015 Sep;102(3)
	Câncer de mama	Khan, S. et al. BMC Cancer. 2015 May 2
	Cancer cervical	Zeng, T. Li, G. Mol Med Rep. 2014 Sep;10(3)
miR-17	Nasofaríngeal	Chen, C. et al. Cancer Med. 2016 Dec;5(12)
	Mama	Liao, XH. et al. Oncotarget. 2017 Feb 28;8(9)
miR-21	Mama	Petrovic N. Mol Diagn Ther. 2016 Apr;20(2)
	Colorretal	Wu, Y. et al. Cell Physiol Biochem. 2017;43(3)
	Cabeça e pesçoço	Tseng, HH. et al. Anticancer Res. 2017 Mar;37(3)
	Pulmão	Xu, FL. et al. PLoS One. 2014 Aug 1;9(8)
	Fígado	Najafi, Z. Sharifi, M. Javadi, G. Cancer Gene Ther. 2015 Nov;22(11)
	Cérebro	Luo, G. et al. Mol Med Rep. 2017 Jan;15(1)
miR-29b	Osteosarcoma	Zhu, K. et al. Protein Cell. 2016 Jun;7(6)
	Colorretal	Ionue A, et al. Ann Surg Oncol. 2015 Dec;22
	Mama	Wang, C. et al. Mol Cell Biochem. 2011 Jun;352(1-2)
	Mama	Li, Y. et al. Cancer Lett. 2017 Jul 1;397
	Glioblastoma	Chung, HJ. et al. Oncotarget. 2015 Jul 30;6(21)
	Melanoma	Schmitt, MJ. et al. Cell Commun Signal. 2012 Dec 17;10(1)
miR-149	Bexiga	Yang, D. et al. Am J Cancer Res. 2017 Nov 1;7(11)
	Pulmão	Zhao, L. et al. Am J Cancer Res. 2017 Nov 1;7(11)
	Melanoma	Chen, W. et al. Am J Transl Res. 2017 Sep 15;9(9)
	Melanoma	Jin, L. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38)
	Osteosarcoma	Xie Z. et al. Biotechnol Lett. 2017 Sep 27.
	Renal	Naya, Y. Ichikawa, T. Seki, N. Int J Mol Sci. 2017 Sep 13;18(9)
miR-150	Pulmão	Suetsugu, T. et al. Int J Oncol. 2017 Dec 21
	Cabeça e pesçoço	Koshizuka, K. et al. Auris Nasus Larynx. 2017 Dec 9. pii: S0385-8146(17)
	Cervical	Zhang, Z. et al. Biomed Pharmacother. 2018 Jan;97
	Osteosarcoma	Xu, J. et al. Oncol Lett. 2017 Aug;14(2)
miR-155	Gástrico	Qu, Y. et al. Cancer Sci. 2017 Dec 16
	Mama	Zuo, J. et al. Cancer Biomark. 2017 Oct 27
	Hepatocelular	Cheng, G. et al. Cancer Cell Int. 2017 Dec 8;17
	Colorretal	Yu, H. et al. Exp Ther Med. 2017 Nov;14(5)
miR-188	Glioma	Li, N. et al. Oncol Res. 2017 Dec 21

	Nasofaringeal	Wu, J. et al. Cell Commun Signal. 2014 Oct 11
	Oral	Wang, L. Liu, H. Tumour Biol. 2016 Mar;37(3)
	Hepatocelular	Fang, F. et al. J Hepatol. 2015 Oct;63(4)
	Próstata	Zhang, H. et al. Oncotarget. 2015 Mar 20;6(8)
miR-199a		Zhong, J. et al. Oncotarget. 2017 May 31;8(48)
	Próstata	Chen, L. Chao, H. Feng, Y. World J Urol. 2017 Dec 4
	Renal	Zhang, X. et al. Onco Targets Ther. 2017 Dec 27
	Gástrico	Zeng, B. Shi, W. Tan, G. BMC Cancer. 2018 Jan 5;18(1)
	Hemangioma	Wang, Y. et al. Int J Immunopathol Pharmacol. 2017 Dec 1
	Hepatocelular	Giovannini, C. et al. Acta Histochem. 2017 Dec 14
miR-208a	Gástrico	Yin, K. et al. Oncotarget. 2016 Oct 11;7(41)
	Pulmão	Tang, Y. et al. J Exp Clin Cancer Res. 2016 Jan 12
	Mama	Sun, X. et al. Oncotarget. 2015 Oct 20;6(32)
miR-210	Bexiga	Yang, X. et al. Am J Cancer Res. 2017 Aug 1;7(8)
	Próstata	Ren, D. et al. Mol Cancer. 2017 Jul 10;16(1)
	Mama	Bar, I. et al. J Histochem Cytochem. 2017 Jun;65(6)
	Hepatocelular	Yang, Y. Oncol Rep. 2016 Nov;36(5)
	Hepatocelular	Tan, W. Lim, S.G. Tan, T.M. World J Gastroenterol. 2015 Dec 14;21(46)
	Osteosarcoma	Zhang, H. Mai, Q. Chen, J. Cell Biol Int. 2017 Mar;41(3)
miR-214	Hepatocelular	Li, Y. et al. Cancer Cell Int. 2017 Nov 7;17
	Gástrico	Yang, L. et al. Cancer Lett. 2018 Feb 1;414
	Ovário	Liu, J. et al. Oncol Lett. 2017 Nov;14(5)
	Cervical e Colorretal	Chandrasekaran, K.S. Sathyanarayanan, A. Karunagaran, D. Cell Biochem Funct. 2017 Oct;35(7)
	Cervical	Wang, J.M. et al. Am J Transl Res. 2017 Aug 15;9(8)
	Bexiga	Ecke, T.H. et al. Cancer Med. 2017 Oct;6(10)
miR-221	Cervical	Wei, W.F. et al. Cell Death Dis. 2017 Dec 14;8(12)
	Ovário	Amini-Farsani, Z. et al. Cytotechnology. 2017 Sep 8
	Mama	Li, B. et al. Chem Biol Interact. 2017 Nov 1;277:33-42
	Bexiga	Liu, H. et al. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017 Jul;21(14)
	Pâncreas	Li, F. et al. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2017 Apr 21
miR-491	Próstata	Xu, Y. et al. Am J Cancer Res. 2017 Dec 1;7(12)
	Osteosarcoma	Duan, J. et al. Mol Med Rep. 2017 Oct;16(4)
	Gástrico	Sun, R. et al. Cell Death Dis. 2017 Mar 30;8(3)
	Pulmão	Gong, F. et al. Am J Transl Res. 2016 Feb 15;8(2)
	Glioma	Qi, Z. et al. BMC Neurol. 2016 Dec 1;16(1)

Azul: supressor de tumor; Vermelho: oncogene. Fonte: própria.

APÊNDICE 8. Produção científica relacionada à tese

Artigo em preparação

Long pentraxin PTX3 inhibits FGF2-positive human malignant melanoma cell growth *in vitro*

João Paulo Silva Nunes; Priscila Fabiana Rodrigues; Raphael Silva Steinberg; Álvaro Cantini Nunes, Cecília Garlanda; Adriana Abalen Martins Dias

Revista a ser submetido: Molecular Cancer Research

Fator de impacto (2017): 4.974 – QUALIS CB1 2013-2016: A2

Artigo publicado

ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar and wound-healing assays

João Paulo Silva Nunes e Adriana Abalen Martins Dias

Revista: BioTechniques

Fator de impacto (2017): 2.943 – QUALIS CB1 2013-2016: B2

Link para acesso: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28403808>

Reports

ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar and wound-healing assays

João Paulo Silva Nunes and Adriana Abalen Martins Dias

Laboratory of Experimental Genetics, General Biology Department – ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

BioTechniques 62:175-179 (April 2017) doi 10.2144/000114535

Keywords: macro; ImageJ; wound-healing; soft-agar; cancer

Supplementary material for this article is available at www.BioTechniques.com/article/114535.

Recent advances in biological imaging techniques and the enormous amount of data they generate call for the development of computational tools for efficient and reliable high-throughput analysis. Several software applications with this functionality are available, and one of the most commonly used is ImageJ. Here, we present two independent macros (WH_NJ and SA_NJ) for automating and facilitating the analysis of images acquired from two in vitro assays frequently used in cancer studies and drug screening: the wound-healing and soft-agar assays. These two algorithms combine, in a single command, the steps required for the individual analysis of each image using ImageJ. WH_NJ and SA_NJ allow fast, reproducible data analysis without the experimental bias inherent in manual analyses, thus guaranteeing the robustness and reliability of the results.

The development of computerized methods for large-scale analyses of imaging data are currently needed to fill the gap between the acquisition of hundreds of images by increasingly fast and efficient automated techniques and the subjective evaluation of those images by researchers (1). For instance, microscopy is an important tool for analyzing changes in cell morphology in response to specific agents, but the amount of data generated by automated techniques greatly exceeds manual processing capacity (2).

Several experimental in vitro methods are currently available to evaluate the effects of drugs on the morphological and physiological characteristics of cancer cells (3). The wound-healing assay and the evaluation of anchorage-independent growth in soft-agar are two classic techniques used for screening antitumor drugs (4,5). The first assay evaluates the effects of selected drugs on cell migration, which is a central feature of tumor metastasis (6,7) that allows neoplastic cells to invade the surrounding blood and lymphatic vessels and spread

to other organs (8,9). The second assay, on the other hand, is one of the tests that most clearly show the malignant transformation of cells, and it is based in the concept that transformed non-neoplastic cells and tumor cells are able to survive, grow, and form colonies in the absence of anchorage (such as to the extracellular matrix in tissues) or contact with neighboring cells (10). These assays have the potential to provide insights on the effects that drugs may have on the morphological characteristics of tumor cells. Both techniques generate results using microscopy and image processing, in which the morphology of migrating or colony-forming cells is examined in response to specific agents.

In recent years, biological imaging techniques have become increasingly sophisticated and accessible, creating a demand for computational tools capable of processing and analyzing the enormous amount of data generated (11). Indeed, several computational tools have been developed to process biological images, such as Matlab (MathWorks, Inc.) (12),

Image Pro Plus (Media Cybernetics) (13), TScratch (CSElab) (14), ColonyArea (15), and other custom-made algorithms for specific tasks. However, the ever-increasing amount of biological images obtained from different experiments has required the further development of tools for processing images able to meet the needs of different tests. Moreover, currently available software applications are not always user-friendly or may be too expensive for many researchers. Thus, there is a need for new automated computational algorithms that perform unbiased, user-friendly analyses of high-throughput data and simplify data processing while guaranteeing robustness and reproducibility of the results at a reasonable cost.

Here, we present two algorithms built using the ImageJ programming language (National Institutes of Health) to facilitate automated analyses of images from cell migration (WH_NJ algorithm) and anchorage-independent growth in soft-agar (SA_NJ algorithm) assays. We used ImageJ since it is a free and open-source application for the processing of

METHOD SUMMARY

We present two independent algorithms, coded using the ImageJ macro language (IJM), that speed up and eliminate bias in the analysis of phase contrast optic microscopy images obtained during wound-healing and soft-agar assays.

multidimensional images (16). Moreover, the flexibility of the ImageJ language allows for multiple plugins and macros to be created for a variety of tasks, facilitating statistical calculations (16).

Currently, analyses of cell migration are most frequently performed by manual tracing of two parallel lines bordering the edges of the regions without cells, by outlining the borders of the wound (17), or by using the sizes of straight lines connecting the borders of the wounds (18–20). For the soft-agar assay, the formula commonly employed is $A = \pi Rr$, where $\pi = 3.14$, and R and r are the longest and the shortest radii, respectively, of the colonies; thus, the researcher must measure the diameter of each colony (21). These techniques are necessarily subjective since the researcher has to manually trace the regions of interest in each image (i.e., areas lacking cells or the areas of the colonies). This is particularly problematic for large-scale drug screening experiments with hundreds of images, when the task becomes laborious and time-consuming (2). The algorithms presented here stand out because they overcome these two problems, allowing precise, rapid, and unbiased analyses of both assays.

Materials and methods

Cell culture and image acquisition

Human melanoma SK-MEL-37 cells were cultured as described in Carey et al. (22). For the wound-healing assay, cells (1.5×10^5) were plated in technical triplicates in 24-well plates (1.9 cm^2 surface area/well). After reaching 100% confluence, 2 wounds ~2-mm wide were made in the monolayer with a 200- μl sterile pipette tip. Detached cells were removed by washing with sterile 1 \times PBS (phosphate buffered saline; USB Affymetrix, Santa Clara, CA) pre-warmed to 37°C. Two independent areas of each lesion were imaged at 0, 12, 24, 48 and 72 h with a Moticam 2300 camera attached to a Motic AE31 inverted phase contrast microscope (Motic Asia, Kowloon Bay, Kowloon, Hong Kong) at 40 \times magnification.

For the soft-agar assay, SK-MEL-37 cells (1.0×10^3) were suspended in 300 μl DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with 10% FBS (ThermoFisher Scientific) and 0.3% ultra-pure agarose (Sigma-Aldrich, St.

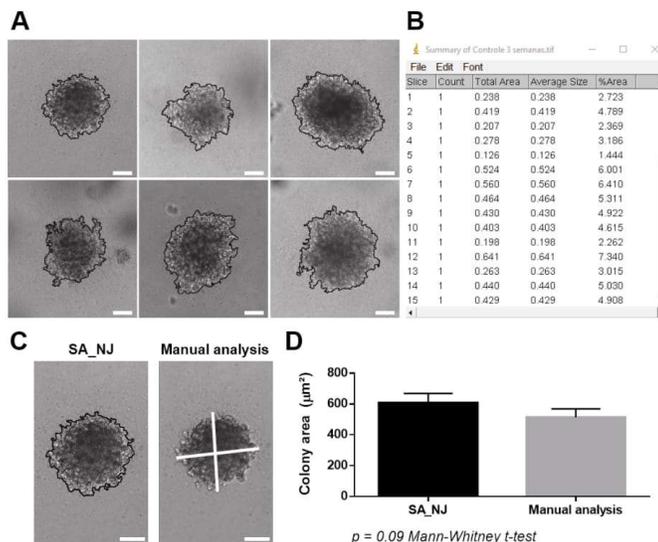


Figure 1. Serial demarcation and calculation of colony area using the SA_NJ macro. The SA_NJ macro developed in this study automatically defines the areas of cell colonies grown in suspension, which are imaged using a phase contrast microscope; the macro generates numerical data corresponding to the area of the colony in relation to the whole image. (A) Delimitation of six colonies with different sizes and shapes (black borders), indicating the regions used by the macro for calculation of area. (B) Window showing a summary of the calculation of the areas of 45 colonies, listing the raw data referring to the number of colonies per image, the total area, the mean size (if there is more than one colony per image), and the percentage of the area of the colony in relation to the total area of the image. (C) Comparison of the calculation of the area of one colony using the SA_NJ macro and the manual method of measuring two diameters ($A = \pi Rr$; R and r are the longest and the shortest radii, respectively). (D) Statistical analysis demonstrating that there was no statistically significant difference in the area measurements using the SA_NJ macro versus the manual method ($n = 45$ colonies). Scale bar: 200 μm .

Louis, MO). The suspension was poured over 300 μl pre-solidified 0.5% agar base (Sigma-Aldrich) in 24-well plates (1.9 cm^2 surface area/well), and the plates were incubated at 37°C with 5% CO_2 atmosphere saturation. Cells were cultivated for 3 weeks, and the growth medium on top of the agarose layer was replaced twice a week. Colonies ($n = 45$) were photographed using a Moticam 2300 camera attached to a Motic AE31 inverted phase contrast microscope at 100 \times magnification.

In both experiments, images of the cells were captured in JPEG format using the Motic Image Plus 2.0 software for Microsoft Windows XP (Redmond, WA). This software captures images of cells visualized on the Motic AE31 inverted phase contrast optic microscope attached to a Moticam 2300 camera. Photograph parameters were optimized to obtain high resolution (i.e., 2048 \times 1536 pixels) and sharpness in the image, and for the best balance of brightness and contrast that

allows for clear distinction of regions with and without cells (Supplementary Figure S1).

Image processing

We used two online open-access software applications to calculate the areas of wounds in the cell migration assay and the sizes of colonies grown in the soft-agar assay: (i) the FastStone Image Viewer 5.7 (www.faststone.org/FISViewerDownload.htm), which clusters images of replicates and/or treatment groups, generating a single file for analysis; and (ii) ImageJ version 1.49, which can be obtained from the RSB home page (<https://imagej.nih.gov/ij/>). The subsequent steps involving the ImageJ macros were executed and tested in the following operating systems: Microsoft Windows versions 7, 8, 8.1, and 10, and Ubuntu 16.04.1 LTS, instructions set x64 and x86.

For the installation of both the WH_NJ and SA_NJ algorithms in Windows, ImageJ needs to be executed and

calibrated (Supplementary Figure S2). The next steps are as follows: click on the menu item "Plugins," sub-menu "Macros," "Install," and in the directory of macros available, select the one of interest and click "Open." After restarting the software, a tab associated with each macro should be available in the ImageJ window under "Plugins."

Optionally, a file with multiple images can be created for an automated analysis of several images. To this end, the following instructions must be executed: open the FastStone Image Viewer, go to the directory where the images are stored, select the photographs of interest (e.g., a control group), go to the menu "Create" and click on "Multi-Page File Builder" (or just press Alt + M). In the new window, choose the TIFF format, select "UNCOMPRESSED" in the option "Compression," and click on "Create." Name the file, choose a destination folder, and click on "Save." Additionally, the user can opt to open all images using the native option available in ImageJ instead of creating a stacked image (Supplementary Figure S3).

After creation of the file and installation of the macros, open the images in ImageJ and execute the algorithm corresponding to the experiment that will be analyzed. The time spent calculating the areas varies

according to the number of images. After the calculation, three new windows will open in ImageJ: (i) ROI Manager, which stores the information about the overlay; (ii) the results window, which shows the areas calculated for each region identified in the image; and (iii) the summary of the results.

Results and discussion

The SA_NJ macro allowed the calculation of the areas of 45 independent colonies of tumor cells grown in suspension in soft agar, with just a single click. This algorithm distinguishes the pixels in the regions with and without cells in the images, precisely identifying the entire extent of the colony. The SA_NJ macro then automatically creates a line surrounding the colonies, clearly defining the region to be used by the macro for calculation of the areas (Figure 1A). Next, ImageJ generates values for each colony, which are summarized in a new window (Figure 1B) showing the area of each colony and the proportion it represents of the whole image.

The mean area calculated by SA_NJ ($607 \pm 59.9 \mu\text{m}^2$) showed no statistically significant difference when compared with the mean area calculated using the manual method of measuring the longest and shortest radii of the colonies and

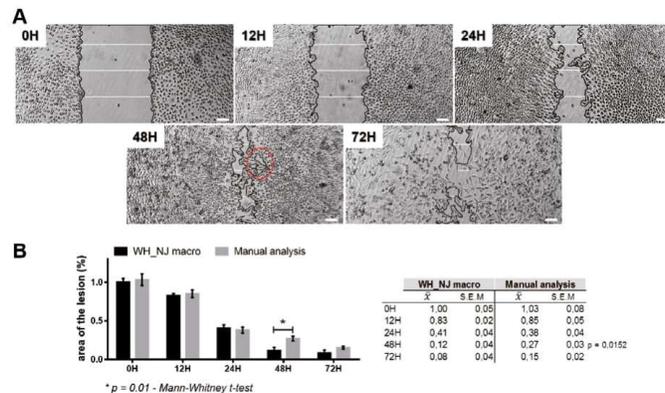
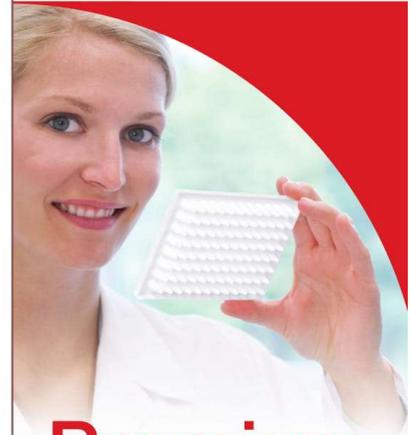


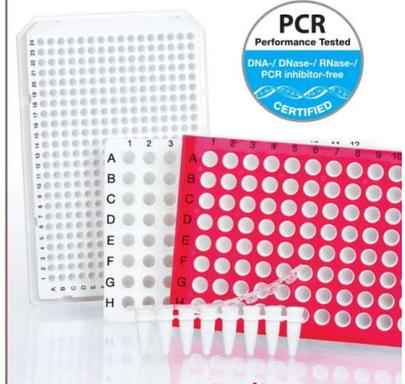
Figure 2. Use of the ImageJ WH_NJ macro for analysis of the wound-healing cell migration assay. Regeneration of a lesion made in the cellular monolayer at time 0 h (H) was evaluated 12, 24, 48, and 72 h (H) after the wound was made. (A) The WH_NJ macro was performed for each time point, and the regions with and without cells were identified (demarcated by the black line) and used for the calculation of the area of the wound. Manual analysis was performed by drawing three parallel lines connecting the edges of the wound for each image (white lines), and the mean length of the lines was used to determine the size of each wound. (B) Graph derived from data from six technical replicates (WH_NJ) and three parallel lines (manual analysis) for each sample showing the percentage of the area of the lesion in relation to the initial (0 H) total area over time. The table shows individual mean (\bar{x}) and standard error of the mean (SEM) values obtained by the two measurement methods. Red circle shows the region omitted from manual measurement. Scale bar: 500 μm .



Premium labware for research and discovery

Certified qPCR Consumables

- Full range of plate styles and 8-strip tubes
- White wells maximize signal reflection
- Optically clear lid strips and sealing tapes



www.sarstedt.com

customerservice@sarstedt.us

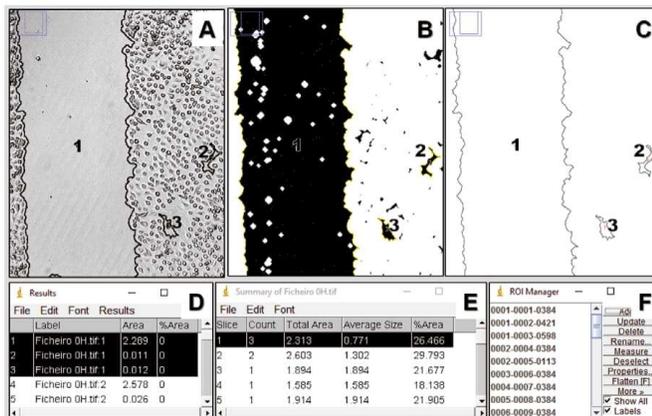


Figure 3. Wound-healing assay data obtained after calculation in ImageJ. The WH_NJ macro was validated by evaluating its precision in the detection and calculation of areas related to wounds made in the cell monolayer, using >300 images. (A) The WH_NJ macro for cell migration assays calculates the area of the wound (A1), but can also detect regions without cells and calculate their areas (A2 and A3). In these cases, the researcher will need to collect data only from the area of the lesion (A1). (B) Automatic conversion of the image in Panel A for calculation of the area. (C) Automatically generated lines that are used to overlay the original image. In these cases, the researcher will need to collect data from the area of the wound (D) only in the window showing the areas of each identified region (including the wound). (E) Summary window in which the information from all of the areas detected in the image are gathered. The percentages of the areas of all of these regions in relation to the total area of the image is shown. (F) ROI Manager, where information regarding the demarcation lines is stored.

applying the formula $A = \pi Rr$ (21) ($513 \pm 53.85 \mu\text{m}^2$) (Figures 1, C and D). This demonstrates that SA_NJ is accurate in measuring the areas of the colonies, with the advantage of being a one-click method. Moreover, the manual method presents additional drawbacks. In some cases, the identification of the longest and shortest diameters is compromised by the morphology of the colony (which is frequently not oval) and requires two or more researchers to perform independent measurements of each colony, making the analysis laborious and time-consuming.

In the wound-healing assay, we employed two methods. The first involved measuring the lengths of three parallel lines connecting the borders of each scratch and using their mean to estimate the size of the lesion (white lines of Figure 2A), whereas the second method used the WH_NJ macro (black lines of Figure 2A). WH_NJ automatically identified the regions without cells (i.e., the wound) and calculated the ratio of this area to the area of the whole image over time (Figure 2A). Our macro showed statistical consistency, as demonstrated by the small standard errors of the mean obtained from the technical triplicates as well as the similarity of the histogram showing closure of the lesion

over time to that obtained using the manual method (Figure 2B). The WH_NJ macro also precisely calculated areas uncovered by the cells that were skipped when using the manual method (red circle in Figure 2A). The high accuracy and precision of the WH_NJ macro affected the results, as demonstrated when wound regeneration at 48 h was compared between the 2 methods: $12 \pm 4\%$ for WH_NJ and $27 \pm 3\%$ for the manual method; $P = 0.0152$ (Figure 2B, 48H). The other advantage of this macro in comparison to other methods (23) is that it specifically detects the regions of the wound in an automated and unbiased way.

In some analyses, however, the sensitivity of the WH_NJ macro can detect holes in areas that are not of interest (Figure 3). In these cases, it is important that the users make an overlay of the line generated by ImageJ (Figure 3, A and B) and the original image. For that, the following steps have to be executed: without closing any window, re-open the original figure (used for the calculation) using ImageJ and go to the menu "Image," option "Overlay," and click on "From ROI Manager" (Figure 3F). The line generated in Figure 3B will be incorporated into the original image (Figure 3C), creating an overlay. In this example,

3 regions were identified, and their respective areas were calculated (Area 1: $2.289 \mu\text{m}^2$, Area 2: $0.011 \mu\text{m}^2$, and Area 3: $0.012 \mu\text{m}^2$) (Figure 3D). In this case, the researcher will have to disregard the Area 2 and Area 3 values when copying the data to a spreadsheet for statistical analysis. In Figure 3E, the sum of the areas calculated for the three regions identified (Area 1, Area 2, and Area 3) is indicated, as well as the mean of these areas and the percentage that these areas represent in relation to the whole image.

Alternatively, it is possible to configure the software to automatically disregard smaller areas using the following steps: close windows B, C, D, and F shown in Figure 3, and go to the menu "Analyze," and "Analyze particles." Keep the options "Display results," "Summarize," and "Add to manager" selected, and in "Size," gradually increase the value by 0.05 points to discard smaller areas. Click OK, and repeat the process of composition to check if the new settings applied are satisfactory. It is worth noting that the established value should be the same for all of the groups analyzed in a given experiment.

ImageJ has the advantage of being a freely distributed software; however, many of its functionalities are not easily appreciated by users, and require basic understanding of computer programming. As a consequence, ImageJ is not always the researchers' first choice for image analysis, and many laboratories opt for commercial tools or outsourced services. Both the WH_NJ and the SA_NJ macros were designed with the aim of circumventing this problem and facilitating analyses of wound-healing and soft-agar assays. They allow for the systematic measurement and analysis of photographs of cell cultures in an automated and reproducible way. Moreover, they are easy to use, require minimal user input, and present numerous advantages relative to other methods currently in use. Additionally, these macros are able to perform large-scale automated analyses of an infinite amount of images, which is not possible using some methods published to date (17,19,24,25). These macros also minimize manual intervention and eliminate the need for expensive and robust fluorescence microscopy tools, or commercial software for image processing, such as Image-Pro Plus (13). A previous study compared the use of Matlab and ImageJ

for assessing the migration rate from an in vitro circular model. The authors wanted highly precise measurements of single-cell migration events from one image at a time and showed that ImageJ generated data with similar robustness to Matlab (12). However, despite being a complete software application that performs many types of biological and statistical analyses, Matlab is a costly and highly complex program that needs to be mastered by the user and requires constant Internet connection. Other free applications used to evaluate the size of scratches (e.g., TScratch, a Matlab derivative) (14) and the area of colonies (e.g., ColonyArea) (15) also require that the user input many parameters, instead of being single-click. Although these applications are powerful and efficient tools, they are not as easy to use as the macros presented here.

The current work presents two computational macros that provided similar results with simpler usage than other comparable software tools. The macros presented here were validated by a comparison with corresponding manual methods and have proven to be ideal for users seeking a simple, efficient, and reproducible way to calculate the pattern of migration and colony formation for their assays.

Both the WH_NJ and SA_NJ macros are available for download from the database of macros at the ImageJ web site, or they can be requested by e-mailing the authors. Both files are available in the formats ".ijm" and ".txt." While the original raw code of the macros is presented in Supplementary Figure S4, they will be updated as requested by users in order to address specific demands.

Author contributions

A.A.M.D. contributed to the conception and design of the work, performed data analysis interpreted results, performed critical revision of the manuscript, and approved the final version of the manuscript. J.P.S.N. contributed to the conception and design of the work, development of algorithms, data collection, analysis, and interpretation, drafting of the article, and approval of the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Acknowledgments

We thank Erna Geessien Kroon and Jônatas Abrahão from the Virology Laboratory (Instituto de Ciências Biológicas/UFMG) for the use of the cell culture and imaging facilities. We are grateful to Priscila Fabiana Rodrigues for testing the macro in several experiments, to Joyce Esposito de Souza for revision of the manuscript, and to CNPq, CAPES, FAPEMIG, and Pro-reitoria de Pesquisa/UFMG for the financial support given to this research.

References

- Wollman, R. and N. Stuurman. 2007. High throughput microscopy: from raw images to discoveries. *J. Cell Sci.* 120:3715-3722.
- Chen, W., C. Wong, E. Vosburgh, A.J. Levine, D.J. Foran, and E.Y. Xu. 2014. High-throughput Image Analysis of Tumor Spheroids: A User-friendly Software Application to Measure the Size of Spheroids Automatically and Accurately. *J. Vis. Exp.* (89):51639.
- Lovitt, C.J., T.B. Shelper, and V.M. Avery. 2014. Advanced Cell Culture Techniques for Cancer Drug Discovery. *Biology (Basel)* 3:345-367.
- Kam, Y., C. Guess, L. Estrada, B. Weidow, and V. Quaranta. 2008. A novel circular invasion assay mimics in vivo invasive behavior of cancer cell lines and distinguishes single-cell motility in vitro. *BMC Cancer* 8:198.
- Rotem, A., A. Janzer, B. Izar, Z. Ji, J.G. Doench, L.A. Garraway, and K. Struhl. 2015. Alternative to the soft-agar assay that permits high-throughput drug and genetic screens for cellular transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112:5708-5713.
- Friedl, P. and K. Wolf. 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3:362-374.
- Sahai, E. and C.J. Marshall. 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* 5:711-719.
- Mattila, P.K. and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:446-454.
- Nguyen, T. and R.M. Mège. 2016. N-cadherin and fibroblast growth factor receptors crosstalk in the control of developmental and cancer cell migrations. *Eur J Cell Biol.* 95:415-426.
- Borowicz, S., M. Van Scoyk, S. Avasarata, M.K. Karuppusamy Rathinam, J. Tauler, R.K. Bikkavilli, and R.A. Winn. 2014. The soft agar colony formation assay. *J. Vis. Exp.* (92):e51998.
- Barry, D.J., C.H. Durkin, J.V. Abella, and M. Way. 2015. Open source software for quantification of cell migration, protrusions, and fluorescence intensities. *J. Cell Biol.* 209:163-180.
- Treloar, K.K. and M.J. Simpson. 2013. Sensitivity of edge detection methods for quantifying cell migration assays. *PLoS One* 8:e67389.
- Yarrow, J.C., Z.E. Perlman, N.J. Westwood, and T.J. Mitchison. 2004. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol.* 4:21.

- Gebäck, T., M.M. Schulz, P. Koumoutsakos, and M. Detmar. 2009. TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques* 46:265-274.
- Guzmán, C., M. Bagga, A. Kaur, J. Westermarck, and D. Abankwa. 2014. ColonyArea: An ImageJ plugin to automatically quantify colony formation in clonogenic assays. *PLoS One*. 9:e92444.
- Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9:671-675.
- Ferreira, A.K., V.M. Freitas, D. Levy, J.L. Ruiz, S.P. Bydlowski, R.E. Ricci, O.M. Filho, G.O. Chierice, and D.A. Maria. 2013. Anti-angiogenic and anti-metastatic activity of synthetic phosphoethanolamine. *PLoS One*. 8:e57937.
- Li, Y., C. Zeng, M. Tu, W. Jiang, Z. Dai, Y. Hu, Z. Deng, and W. Xiao. 2016. MicroRNA-200b acts as a tumor suppressor in osteosarcoma via targeting ZEB1. *Oncol Targets Ther.* 9:3101-3111.
- David, D., S. Jagadeeshan, R. Hariharan, A.S. Nair, and R.M. Pillai. 2014. Smurf2 E3 ubiquitin ligase modulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells in a CNKSR2 dependent manner. *Cell Div.* 9:2.
- Jiang, F., T. Liu, Y. He, Q. Yan, X. Chen, H. Wang, and X. Wan. 2011. MiR-125b promotes proliferation and migration of type II endometrial carcinoma cells through targeting TP53INP1 tumor suppressor in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 11:425.
- Rodrigues, D.F., F.F. Mendes, T.A. Dias, A.R.d. Lima, and L.A.F.d. Silva. 2013. O programa ImageJ como ferramenta de análise morfométrica de feridas cutâneas. *Enciclopédia Biosfera*. 9:1955-1963.
- Carey, T.E., T. Takahashi, L.A. Resnick, H.F. Oettgen, and L.J. Old. 1976. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3278-3282.
- Ho, B.Y., C.H. Lin, M.K. Apaya, W.W. Chao, and L.F. Shyur. 2012. Silibinin and Paclitaxel Cotreatment Significantly Suppress the Activity and Lung Metastasis of Triple Negative 4T1 Mammary Tumor Cell in Mice. *J. Tradit. Complement. Med.* 2:301-311.
- Wu, W., J. Yang, X. Feng, H. Wang, S. Ye, P. Yang, W. Tan, G. Wei, and Y. Zhou. 2013. MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells. *Mol. Cancer* 12:30.
- Aguiar, C., J. Therrien, P. Lemire, M. Segura, L.C. Smith, and C.L. Theoret. 2016. Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. *Equine Vet. J.* 48:338-345.

Received 16 November 2016; accepted 30 January 2017.

Address correspondence to: Adriana Abalen Martins Dias, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil - 31270-901. E-mail: abalen@ufmg.br

To purchase reprints of this article, contact: biotechniques@fosterprinting.com

Resumos

1. OLIVEIRA, F. I. S. ; RODRIGUES, P. F. ; **NUNES, J. P. S.** ; DIAS, A. A. M. . Caracterização da expressão da Pentraxina 3 e dos mediadores pró-inflamatórios IL1B e TNFA em resposta a LPS e Toxina A de Clostridium difficile. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. **NUNES, J. P. S.**; RODRIGUES, P. F. ; DIAS, A. A. M. . A Pentraxina 3 possui dualidade de funções na proliferação celular in vitro de células tumorais que expressam FGF2. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. OLIVEIRA, F. I. S. ; RODRIGUES, P. F. ; **NUNES, J. P. S.** ; DIAS, A. A. M. . Caracterização da expressão da Pentraxina 3 e dos mediadores pró-inflamatórios IL1B e TNFA em resposta a Toxina A de Clostridium difficile. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. OLIVEIRA, F. I. S. ; RODRIGUES, P. F. ; **NUNES, J. P. S.** ; DIAS, A. A. M. . Caracterização da expressão da Pentraxina 3 em células epiteliais intestinais humanas. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
5. **NUNES, J. P. S.**; RODRIGUES, P. F. ; BAHIA, D. ; DIAS, A. A. M. . Evaluation of biological activity of Pentraxin 3 in human tumoral cell lines. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
6. OLIVEIRA, F. I. S. ; **NUNES, J. P. S.** ; RODRIGUES, P. F. ; DIAS, A. A. M. . Caracterização da expressão da Pentraxina 3 em células epiteliais intestinais humanas. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
7. SILVA, F. S. D. ; **NUNES, J. P. S.** ; DIAS, A. A. M. . Padronização de PCR Duplex para detecção de micoplasma em cultivos de células. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
8. RODRIGUES, P. F. ; **NUNES, J. P. S.** ; BAHIA, D. ; DIAS, A. A. M. . Pentraxin 3 expression in murine sarcomas and melanomas. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
9. OLIVEIRA, F. I. S. ; RODRIGUES, P. F. ; **NUNES, J. P. S.** ; DIAS, A. A. M. . Caracterização da expressão da Pentraxina 3 em células epiteliais intestinais humanas. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).

APÊNDICE 9. Colaboração em outros projetos de pesquisa

1. Caracterização do microbioma da Glândula mamária bovina saudável e com mastite subclínica e seleção de bactérias potencialmente probióticas isoladas deste ecossistema.

Projeto de doutorado do aluno Raphael da Silva Steinberg. M. Sc. UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Orientador: Dr. Álvaro Cantini Nunes. Co-orientadores: Dr. Jacques Robert Nicoli e Dra. Elisabeth Neumann.

Participação: ensaios de proliferação celular das células MDA-MB-231 utilizando MTT

2. Efeito do silenciamento gênico do Tnfa na preservação auditiva em ratos wistar expostos ao ruído e análise da expressão gênica da via metabólica do Tnfa.

Projeto de doutorado da aluna Janaína Cândida Rodrigues. M.Sc. FMUSP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Orientador: Prof. Dr. Rubens Vuono de Brito Neto. Co-Orientadora: Dra. Karina Lezirovitz Mandenbauem

Participação: análise dos resultados de expressão gênica por RT-qPCR.

3. Efeito Biológico da Proteína Pentraxina 3 em Fibrossarcomas Murinos.

Projeto de doutorado da aluna Priscila Fabiana Rodrigues. M.Sc. UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Orientadora: Adriana Abalen Martins Dias.

Participação: análise da expressão gênica basal por PCR, construção de iniciadores para RT-PCR e RT-qPCR.

4. Atividades antimicrobiana, antitumoral e imunomoduladora de extratos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.

Projeto de mestrado da aluna Jaqueline Alves Senabio. UESC - Universidade Estadual de Santa Cruz, dezembro de 2015, Orientadora: Dra. Jane Lima dos Santos. Co-orientador: Dr. Marcos Antônio Soares. Conselheiro: Dr. Antônio Macho Queirós.

Participação: análise do ciclo celular utilizando citometria de fluxo e ensaios de cicatrização *in vitro*.

5. Efeito da proteína Pentraxina 3 sobre as características morfológicas e fisiológicas de células tumorais humanas.

Projeto de mestrado do aluno Octávio Mangabeira Sobrinho. UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Orientadora: Dra. Adriana Abalen Martins Dias.

Participação: desenho e otimização dos iniciadores para RT-qPCR, análise dos resultados de expressão gênica. ensaios de ciclo celular utilizando citometria de fluxo.

6. Avaliação do efeito biológico do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* sobre células tumorais humanas

Projeto de mestrado da aluna Bárbara Gomes Kunzmann. UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Orientadora: Dra. Adriana Abalen Martins Dias.

Participação: análise do ciclo celular por citometria de fluxo.

7. Caracterização da expressão da Pentraxina 3 em células epiteliais intestinais humanas tratadas com a Toxina A de *Clostridium difficile*

Projeto de Iniciação Científica da aluna Flávia Ivair Santiago de Oliveira. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Orientadora: Adriana Abalen Martins Dias.

Participação: desenho e otimização dos iniciadores para RT-qPCR, análise dos resultados de expressão gênica.

APÊNDICE 10. Co-orientações de alunos de Iniciação Científica

Concluídos

1. Leonardo Otávio Ferreira Dourado. TCC para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas:

Estabelecimento e padronização do Banco de Células do Laboratório de Genética Experimental do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG.

Orientadora: Adriana Abalen Martins Dias

2. Estefânia Queiroz Nicásio: TCC para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas:

Análise da contaminação por micoplasma das linhagens do banco de células criopreservadas do Laboratório de Genética Experimental da UFMG.

Orientadora: Adriana Abalen Martins Dias

3. Flávia Santos Delgado Silva. Trabalho de iniciação científica:

Padronização de PCR Duplex para detecção de micoplasma em cultivos de células.

Orientadora: Adriana Abalen Martins Dias

Em andamento

1. Ana Flávia Bráz

Título do projeto: Sistema de qualidade do banco de células do LGEX: manejo, gerenciamento e controle de micoplasma.

Orientadora: Adriana Abalen Martins Dias

2. Victor Vidal Moura.

Título do projeto: Sistema de qualidade do banco de células do LGEX: manejo, gerenciamento e controle de micoplasma.

Orientadora: Adriana Abalen Martins Dias

APÊNDICE 11. Premiação

69ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC

16 A 22 DE JULHO DE 2017 | UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS | BELO HORIZONTE - MG - BRASIL

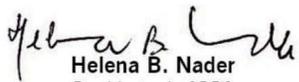
CERTIFICADO

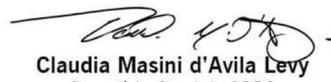
Certificamos que o trabalho **A PENTRAXINA 3 POSSUI DUALIDADE DE FUNÇÕES NA PROLIFERAÇÃO CELULAR IN VITRO DE CÉLULAS TUMORAIS QUE EXPRESSAM FGF2**, de autoria de *João Paulo Silva Nunes, Priscila Fabiana Rodrigues e Adriana Abalen Martins Dias*, foi laureado com Menção Honrosa entre os melhores da área de Genética submetido à Sessão de Pôsteres da 69ª Reunião Anual da SBPC, realizada de 16 a 22 de julho de 2017, na Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte/MG.

Emissão: Agosto de 2017.

Certificado nº AH69RA2086 - Este número permite a verificação da autenticidade deste documento no site da SBPC:
<http://portal.sbpnet.org.br/certificados/>




Helena B. Nader
Presidente da SBPC
Coordenadora da 69ª Reunião Anual


Claudia Masini d'Avila Levy
Secretária-Geral da SBPC
Coordenadora da 69ª Reunião Anual

APÊNDICE 12. Participação em eventos científicos no período

1. 69ª Reunião Anual da SBPC.
2. Aula Inaugural da Pós-Graduação NAPG / ICB. 2017. (Seminário).
3. IV Simpósio Acadêmico de Biomedicina. 2016. (Simpósio).
4. I Workshop Mineiro de Ciências Forenses. 2016. (Outra).
5. Workshop Biologia Sistêmica do Câncer. 2016. (Simpósio).
6. XXV Semana de Iniciação Científica / PRPQ. 2016. (Exposição).
7. III Simpósio da Comissão de Ética no Uso de Animais. 2015. (Simpósio).
8. Innate Immunity of Infectious and Degenerative Diseases: From Interleukin-1 do Systems Biology. 2015. (Outra).
9. VII Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia. 2015. (Simpósio).
10. XXIV Semana de Iniciação Científica / PRPQ. Participação da equipe de avaliadores dos trabalhos apresentados. 2015. (Exposição).
11. XXIV Semana de Iniciação Científica / PRPQ. 2015. (Exposição).
12. XXIII Semana de Iniciação Científica / PRPQ. 2014. (Exposição).