

JORGE AUGUSTO BORIN SCUTTI

Efeito do silenciamento do supressor de sinalização
de citocinas 1 (SOCS-1) em células de melanoma
murino B16F10-Nex 2

Dissertação apresentada á
Universidade Federal de
São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

São Paulo 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Efeito do silenciamento do supressor de sinalização
de citocinas 1 (SOCS-1) em células de melanoma
murino B16F10-Nex 2

Orientador: Prof. Dr. Luiz R. Travassos

Co-Orientador: Dr. Alisson Leonardo Matsuo

Dissertação apresentada á
Universidade Federal de
São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

São Paulo 2010

Scutti, Jorge Augusto Borin

Efeito do silenciamento do supressor de sinalização de citocinas 1 (SOCS-1) em células de melanoma murino B16F10-Nex 2/ Jorge Augusto Borin Scutti – São Paulo, 2010.

87 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.

Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês: The effects of silencing of Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS-1) in murine melanoma B16F10-Nex2

1-) Melanoma murino B16F10-Nex2

2-) SOCS-1

3-).RNA de interferência

4-).Câncer

Trabalho realizado na Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX), no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – com auxílio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Mesmo estando na estrada certa, você pode ser atropelado se ficar sentado nela.

Will Rogers

“Há homens que lutam um
dia e são bons
Há outros que lutam um
ano e são os melhores.
Há os que lutam muitos
anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam
toda a vida.
Esses são os
imprescindíveis.”

Bertolt Brecht

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida
passar;
É melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o
final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me
esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que
em conformidade viver ..."

Martin Luther King

“Se um dia, já homem feito e realizado, sentir que a terra cede a meus pés, que obras desmoronem e que não há ninguém à minha volta para estender a mão, esqueço minha maturidade, passo pela minha mocidade, volto à minha infância e balbucio, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre me restarão na alma serão: meus avós, Hormindo Borin e Ignez Borin”;
Aos meus pais Paulo Henrique e Izabel Cristina, pela vida;
Ao meu irmão, Pedro Henrique
À toda a minha família e amigos verdadeiros, os quais foram importantes nessa escalada chamada vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pois sem ela nada disso estaria acontecendo em minha vida.

Aos meus tios e tias, João Paulo Borin pelo exemplo a ser seguido e Sérgio Henrique Borin, meu desafiante de tênis nas tardes de domingo no Clube Náutico de Araraquara, pelos exemplos que segui até agora e pretendo não parar de segui-los tão cedo, tia Lilian, um doce em pessoa, tia Cláudia, a bailarina da família, tia Regina exemplo de força, ao meu primo, Thiago, exemplo de perseverança, minhas primas Júlia Borin pela parceria nos amendoins e Natália Borin pela parceria nos pistaches na casa de meus avós, e assim como seus pais foram meus exemplos, espero que alguma coisa boa possa passar a elas.

In memoriam a minha bisavó Irma Borin, que nunca desistiu de rezar por mim, e tenho certeza que grande parte de tudo o que aconteceu e acontece comigo hoje, ela tem uma grande participação lá de cima.

Ao meu orientador, prof. Dr. Luiz Rodolpho Travassos, uma pessoa com um conteúdo de vida imensurável e um intelecto digno de um cavalheiro. Se fosse atribuir a sua imagem a um personagem, esse seria o mestre Yoda, pois conhecimento e paciência são uma de suas virtudes, as quais tive a honra de presenciar. Fico muito feliz por fazer parte dessa geração Travassos (não sei ao certo qual a minha geração!). Momentos de aprendizado, reuniões e journal club, foram essenciais para o desenvolvimento crítico científico. Da minha parte, acho que o fiz dar boas risadas. Muito obrigado por tudo professor, pela força, paciência, pelo auxílio, pelo carinho, principalmente pelos conselhos fora da hora do expediente, os quais foram essenciais durante os momentos difíceis que passei em um determinado período de minha vida. O Sr. é realmente um pai!

A profa. Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues, uma pessoa sensacional e com um coração meigo e doce que lhe é peculiar, dona de palavras e conselhos que até hoje regem o meu caminhar. Aprendi muito com você professora, e você sempre será a minha eterna professora, e eu serei sempre o “galã de quermesse”.

Aos meus verdadeiros amigos de laboratório UNONEX, os quais faço questão de listar um a um:

Ana Beatriz, companheira, irmã, que me ensinou muito nesse período em que passamos juntos no laboratório. Dentre o que aprendi “brother”, “véio”, “coré”, “farô”, e acima de tudo, como fazer gráficos, ensaio clonogênico e que tese é de doutorado, mestrado é dissertação. Além disso, foi à única pessoa que até hoje me fez chorar no dia do meu aniversário, mesmo estando em Houston, bastou um único e-mail, e por isso, é a minha vez de respondê-lo aqui.

Ana, a seqüência palindrômica mais sucinta e cheia de surpresas, a amiga que todos os meninos querem ter, se brega ou chique você estiver, não importa, ela vai te falar, a “burguesinha” dona de todo o Mato Grosso do Sul mais humana e desapegada de luxos, a “nerd” mais pop, de gostos mais excêntricos, a garota mais Cold Play que eu já conheci. Se vamos sair? Que seja de ônibus, a pé, de táxi, de charrete, não importa, só não fure com ela, experiência própria, isso vai te custar algumas semanas emburrada. Dona de frases consagradas, de conselhos, de atenção. Companheira não só nos dias difíceis, mas em tempos de alegria e descontração, que diga Salvador hein! Boas risadas. Poderia ficar aqui descrevendo você ao longo dessa dissertação, não com a mesma destreza e facilidade como nas palavras de Dostoiévski ou Paul Auster, mas tenho certeza que suas qualidades dariam um artigo de revisão, ao qual publicaria na Nature.

Palavras como “cell scraper”, “up and down”, “fusão” e “repique” ganharam novos sentidos em nossas vidas!

Amo você, de coração!

Take care!

Alisson, o eterno Alissera! Sem palavras. Meu amigo, irmão, companheiro, palmeirense, co-orientador, chefe, um dos caras mais inteligentes que já conheci. Em seu mundo de cientista já fiz parte do grupo dos sábios e dos “mongóis”. Um cara que acima de tudo é dono de um coração imenso e de uma cabeça maior ainda. Dizem que Deus dá sabedoria ou coração, nunca ambos, mas esse cidadão é a exclusão de todas essas regras.

Sabe que você é realmente uma pessoa espetacular e que parte de tudo o que foi concretizado hoje teve o seu total apoio. Sou muito grato a Deus por ter colocado você no meu caminho. Você sempre será o “cara” dono de idéias geniais.

Andrey, meu eterno mentor. Acho que somente essa frase dispensa comentários sobre você. Uma pessoa genial e acima de tudo de bom coração.

Felipe, de Diadema para a Suíça e da Suíça para o mundo. Isso vai ser pouco para você Fê! . Um amigão e companheiro para todas as horas. Um cara sério, responsável e acima de tudo honestíssimo. Uma pessoa que durante esses anos de convívio, me ajudou não só nos experimentos, mas também por ser um exemplo vivo de um vencedor. Te considero meu irmão, e você sabe disso! Você foi peça ímpar no desfecho desse trabalho.

Filipe, mais hoje em dia atende melhor pelo seu pseudônimo Fizão. Mais uma pessoa que dispensa comentários. Um irmão e companheiro para todas as horas, um amigo “class”. Perder hora ou esquecer uma reunião? Isso sim, às vezes, ninguém é de ferro né? Mas esquecer dos amigos? Isso nunca. Esse tempinho ele sempre encontra em sua agenda . Fizuca, um dia vou ver seu nome escrito como docente de alguma Universidade e terei a honra de dizer: “Dividi a bancada com esse professor”, ou melhor, “ A bancada que eu fiz o Mestrado era dele”! Também te considero um irmão Fi!

Luis Marchi, “brother” e parceiro de futebol das sexta feiras na Atlético, dono de um senso de humor e inteligência invejáveis. Cabeludo ou no carecas? Lá estamos nós! Quando voltava de baladas e não tinha para quem ligar, era ele que eu escolhia para acordar. Velhos tempos hein big Luis?

Mariana, vulgo Mari Massa, a prima do Cléber! A minha versão feminina, precisa falar mais alguma coisa? Uma pessoa maravilhosa e muito inteligente. Minha irmã, companheira e parceira nos experimentos fora de hora. Com ela Ribeirão Preto e Salvador nunca mais serão as mesmas.

Juliana, nossa eterna caipirinha e uma amiga sem palavras. Doce e meiga encantou a todos com o seu “alôr”.

Fabiana, a fada da UNONEX! Uma pessoa sensacional, e dona de um carisma contagiante. Altas batalhas de vídeo game em sua residência juntamente com o seu marido André, ou mais conhecido como “Morzão”.

Carlos, o Pirostégia para os mais íntimos. Uma pessoa de bom coração e também criado pela vó.

Thaysa, a mãe do nosso laboratório. Uma pesquisadora de essência e doce, mas nunca ousem desconectar o cabo da internet de seu computador e plugar em outro, experiência própria!

Manu, nossa eterna musa da ginástica olímpica Daiane dos Santos, uma pessoa que me fez dar boas risadas e se mostrou muito companheira quando estava na UNONEX. Desejo a maior sorte do mundo a você, pois você merece.

Eliana, a vulgo Eli, que nos contagia de vez em quando com a sua presença relâmpago durante os almoços. Obrigado pelos momentos alegres.

Natasha, a iniciação científica com o vocabulário mais amplo dos “tipo assim” que já passou na UNONEX. Obrigado pelas boas risadas.

A todos os amigos e amigas que compartilhavam o 8º andar: Luana, Denise, Karina, Bianca, Mococa, Léo, Thiago, Teresa, Sheila, Renata, Janete, Sasaki, Anderson, Flávia, Milene, Larissa, Bruna, Rodrigo e Júnior. Os dois últimos já tinham até o patrimônio da Escola Paulista de Medicina!.

Aos funcionários, sujeitos que dão vida e direcionam o andamento da Universidade Federal de São Paulo: Mércia, (minha eterna rainha), Cláudio, Claudécir, Sr. Américo (já me pegou dormindo no laboratório algumas vezes), Márcia (pelo confessionário de todas as tardes), Marcelo (altos papos sobre futebol, política e outras coisinhas mais...), Luisão (parceiro) Dona Maria, Orion, Rose e Dona Creuzinha (esteja onde estiver, eu lembrei da Sra!).

As amigas e funcionários do Sampa Café, que durante dois anos me aturaram e penduraram as minhas contas: Mauro, Celina, Penha, Ju, Cris e Sandrinha.

Aos meus amigos e irmãos da República, Mococa e Juca, os quais foram seres excepcionais em todos os momentos que convivi com eles e nossa amizade vai muito mais longe daqui.

A “galera da muscula” Mococa, Nicolas, Montanha, Pancada, Alisson, Marcinho e toda a cúpula do crescimento

Índice

Abreviaturas.....	I
Lista de figuras.....	II
Resumo.....	III
Summary.....	IV
Introdução	
Câncer: Caracterização e Histórico.....	1
Ciclo celular e envolvimento tumoral.....	2
Resposta Imunológica a tumores.....	5
Melanoma, incidência e desafios.....	8
Microambiente e escape tumoral.....	14
Sinalização no melanoma.....	18
RNA de Interferência (RNAi) e mecanismo de silenciamento.....	23
Objetivos	
Geral.....	30
Específicos.....	30
Materiais e Métodos	
<i>Ensaio <i>in vitro</i></i>	
Animais.....	31
Linhagens celulares.....	31
Produção de partículas lentivirais contendo a construção para expressão de shRNAi para SOCS-1 e seqüenciamento.....	32

Transfecção de células de melanoma B16F10 nex 2 com os vetores virais e obtenção dos clones B16pLKO e B16 Δ SOCS- 1.....	33
Ensaio de formação de colônias das linhagens B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	35
Extração do mRNA das linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1 e síntese de cDNA pelo método da Transcriptase Reversa (RT).....	35
Análise da expressão gênica de SOCS-1 em tempo real (RT-PCR) nos transcritos de B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	35
Detecção da proteína SOCS-1 através do Western Blot nas linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	36
Ensaio de migração das linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	37
Ensaio de invasão celular utilizando transwell-MATRIGEL com as linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	37
Ensaio clonogênico das linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	38
Ensaio de proliferação celular das linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	38
Análise morfológica das linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1 utilizando DAPI e Faloidina.....	38
Avaliação do ciclo celular nas linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1 por citometria de Fluxo (FACS).....	39
Avaliação da expressão de determinados receptores intracelulares e extracelulares nas linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1 por citometria de fluxo (FACS).....	39
Ensaio in vivo	

Modelo subcutâneo.....	40
Curva de sobrevida.....	40
Modelo metastático (Modelo endovenoso).....	41
Análises estatísticas.....	41
Resultados	
Análise da expressão gênica de SOCS-1 em tempo real (RT-PCR) nos transcritos de B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	42
Detecção da proteína SOCS-1 através do Western Blot nas linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	44
Ensaio de proliferação celular nas linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	45
Ensaio de migração celular nas linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	47
Ensaio de invasão celular utilizando transwell- MATRIGEL com as linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	49
Ensaio clonogênico das linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.....	51
Análise morfológica das linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1 utilizando DAPI e Faloidina.....	52
Avaliação do ciclo celular nas linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1 por citometria de fluxo (FACS).....	56
Avaliação da expressão de receptores nas linhagens B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1 por citometria de fluxo (FACS).....	58
Ensaio <i>in vivo</i>	59
Discussão	64
Conclusões	72

Bibliografia.....	73
--------------------------	-----------

Abreviaturas I-

CdKs: Quinases dependentes de ciclina

pRB: Proteína do retinoblastoma

E2F: Fator de alongação da tradução

Fas: Receptor de morte celular

TNFR1: Receptor do TNF

TNF: Fator de necrose tumoral

ATP: Adenosina trifosfato

NK: Células natural killer

APC: Células apresentadoras de antígenos

NO: Óxido nítrico

IFN: Interferon

ROI: Intermediários reativos de oxigênio

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

HLA: Antígeno leucocitário humano

IL: Interleucina

ADCC: Citotoxicidade celular mediada por anticorpo

CTLs: Linfócitos T citotóxicos

TAA: Antígenos associados a tumores

U.V: Radiação ultravioleta

IARC: International Agency for Research Cancer

AIHW: Australian Institute of Health and Welfare

INCA: Instituto Nacional do Câncer

FGF: Fator de crescimento fibroblástico

MGSA: Atividade estimuladora de crescimento do melanoma

PDFG: Fator de crescimento derivado de plaquetas

Fase S: Fase de síntese de DNA

Fase G1: Fase de crescimento 1 do ciclo celular

Fase G2: Fase de crescimento 2 do ciclo celular

HGF/SF: Fator de crescimento de hepatócitos

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

TLR: Toll-like receptor

PAMPs: Determinante molecular associado a patógenos

TCR: Receptor de célula T

BCR: Receptor de célula B

SOCS: Supressor of cytokine signaling

M1: Macrófagos com perfil Th1

M2: Macrófagos com perfil Th2

CCL2: Ligante de quimiocina 2

CSF1: Fator estimulador de colônia 1

NF κ B: Fator nuclear κ B

iGb3: Glicosfingolípídeo isoglobotrihexosilceramida 3

STAT: Fator de ativação da transcrição

RNA: Ácido ribonucléico

DNA: Ácido desoxiribonucléico

ERKs: Quinases reguladoras de sinais extracelulares

MAPK: Quinase ativadora de mitose

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinase

JAK: Janus quinase

dsRNA: Dupla fita simples de RNA

PTGS: Silenciamento gênico pós transcricional

mRNA: RNA mensageiro

RISC: Complexo de silenciamento induzido pelo RNA

UNONEX: Unidade de Oncologia Experimental

RT-PCR: Reação de cadeia polimerase em tempo real

VAV1: Fator de troca do nucleotídeo guanina

CML: Leucemia mielóide crônica

ALL: Leucemia linfóide aguda

RNAi: RNA de interferência

siRNA: Small interference RNA

shRNA: Small hairpin RNA

PI: Iodeto de propídio

HEK293: Células humanas de rim

psPAX2: Plasmídeo responsável pelo empacotamento viral

pMD2G: Plasmídeo responsável pelo envelope viral

cDNA: DNA complementar

HPRT: Fosforibosiltransferase

KIR: Receptor inibidor de morte celular

SBF: Soro Fetal Bovino

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

BSA: Albumina bovina

EGFR: Receptor fator de crescimento epitelial

pEGFR: Receptor fosforilado do fator de crescimento epitelial

FGFR: Receptor do fator de crescimento fibroblástico

kDa: Kilo Daltons

CSC: Cancer stem cells

AML: Carcinoma Ovariano

BCL-2 e BCLx: Proteínas anti-apoptóticas

FAK: Quinase de adesão focal

TRKB: Receptor neutrofílico

TKI: Inibidor de tirosina quinase

Lista de figuras II

Figura 1: Progressão e transformação dos melanócitos

Figura 2: Papel das principais citocinas no microambiente tumoral

Figura 3: Estrutura e função das proteínas SOCS-1

Figura 4: Paper publicado por Fire *et al.*, 1998

Figura 5: Indução do silenciamento gênico através do RNA de interferência

Figura 6: Construção do plasmídeo para expressão shRNAi

Figura 7: Análise da expressão relativa dos transcritos de SOCS-1 em linhagens B16pLKO e B16 Δ SOCS-1

Figura 8: Detecção da proteína SOCS-1 nas linhagens celulares

Figura 9: Ensaio de crescimento celular das linhagens celulares

Figura 10a: Ensaio de migração (Monolayer wound healing assay) celular

Figura 10b: Porcentagem média da migração celular (“Monolayer wound healing assay”): Dados quantitativos da migração mostrada na figura 9a

Figura 11: Ensaio de invasão utilizando Matrigel transwell

Figura 12: Ensaio clonogênico

Figura 13a: Microscopia de fluorescência: Células marcadas com DAPI e Faloidina

Figura 13b: Análise da área nuclear das linhagens celulares

Figura 14: Análise do ciclo celular através da citometria de fluxo

Figura 15: Análise da expressão dos receptores dos fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento tumoral de melanoma através da análise por citometria de fluxo

Figura 16a: Modelo *in vivo* de crescimento tumoral das linhagens B16pLKO, B16 wild type e B16 Δ SOCS-1

Figura 16b: Curva de sobrevida dos animais desafiados com as linhagens B16pLKO, B16 wild type e B16 Δ SOCS-1

Figura 16c: Contagem dos nódulos pulmonares no ensaio metastático

Figura 16d: Imagem dos nódulos pulmonares no ensaio metastático

Figura 16e: Peso dos pulmões após o ensaio metastático

Resumo III

O melanoma é um tumor de origem neuroectodérmica resultante da proliferação e transformação maligna dos melanócitos, os quais se originam de precursores da crista neural que então migram para a pele e folículos capilares durante o processo de embriogênese, e se apresentam como células especializadas que produzem melanina, encontradas na camada basal da epiderme e nos folículos do cabelo onde sua homeostase é regulada pelos queratinócitos da epiderme. A última década assistiu a grandes avanços em aspectos celulares e moleculares do melanoma. As implicações terapêuticas contribuíram para o entendimento das vias de regulação nas células tumorais que resultam de complexas alterações em múltiplas cascatas de sinalização, controlando a mobilidade, controle do crescimento, invasão, metabolismo, liberação de citocinas e capacidade de escapar da resposta imune. No presente trabalho, o silenciamento com shRNAi de uma proteína reguladora da via de sinalização JAK / STAT denominada SOCS- 1 foi capaz de reverter o fenótipo tumorigênico das linhagens de melanoma murino B16F10-Nex2 inibindo a progressão e desenvolvimento tumoral e assim, um novo marcador crítico do melanoma metastático pode ser estudado de maneira isolada. Nos ensaios *in vitro* o silenciamento de SOCS-1 inibiu o crescimento e regulação do ciclo celular, motilidade e a invasão de Matrigel pelas células de melanoma. O ensaio clonogênico demonstrou a participação de SOCS-1 como um modulador de resistência ao *anoikis*. Além disso, o silenciamento de SOCS-1 culminou na redução da expressão de receptores tais como receptor do fator de crescimento endotelial (EGF), receptor de insulina e fator de crescimento fibroblástico (FGF). Nos ensaios *in vivo* o silenciamento de SOCS-1 inibiu o crescimento tumoral e metastático. Coletivamente, estes dados sugerem que o silenciamento da expressão da proteína SOCS-1 em células de melanoma é um evento crítico, levando a um perfil não tumorigênico. O silenciamento da expressão de SOCS-1 é uma abordagem nova e promissora para aumentar os alvos terapêuticos e assim prevenir o desenvolvimento e a progressão do melanoma.

Summary IV

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and its incidence has increased dramatically over the years. The origin of melanoma is neuroectodermal and it results from the proliferation and malignant transformation of melanocytes that originate from the neural crest and migrate to the skin and hair follicles during embryogenesis. The last decade has seen major advances in both cellular and molecular aspects of melanoma biology and therapeutic implications. Knowledge on the regulatory pathways involved in melanoma development and progression has advanced significantly in recent years. It is now recognized that melanoma development is regulated by multiple cascade signaling pathways that affect, motility, growth control, invasion, metabolism, cytokine release and the ability to escape immune response. Here, we demonstrate a novel signaling mechanism whereby silencing of SOCS-1 protein, a negative regulator of Jak/Stat pathway, leads to partial reversion of the tumorigenic phenotype of B16F10-Nex2 melanoma cells. SOCS-1 silencing with small hairpin RNA inhibits *in vitro* growth by cell cycle regulation and S phase arrest, motility inhibition and decreased melanoma cell invasion through Matrigel. Clonogenic assay showed that SOCS-1 acted as a modulator of anoikis resistance. Additionally, downregulation of SOCS-1 expression decreased the expression of epidermal growth factor (EGF), insulin receptor and fibroblast growth factor receptor (FGFR). We further demonstrate by *in vivo* assay that SOCS-1 silencing inhibits tumor growth and metastatic spread in the lungs. Collectively, these data show that silencing of SOCS-1 protein expression in melanoma cells is a critical event, leading to nontumorigenesis and incapacity to metastasize.

Introdução

Câncer: Caracterização e Histórico

O câncer é a denominação do latim cancer, derivado da palavra grega *karkinos* que quer dizer caranguejo, e designa uma doença caracterizada por um conjunto de alterações multifatoriais, os quais compartilham um evento em comum, a proliferação e o crescimento desordenado de células. O câncer pode ser caracterizado de acordo com o seu potencial de agressividade, sendo maligno, quando adquire a capacidade funcional de se espalhar por metástases para outras regiões do corpo, e assim, dividem-se mais rapidamente e tornam-se incontroláveis, fato este que determina o acúmulo de células cancerosas e colonização total de um tecido. Por outro lado, o comportamento de uma massa tumoral com um potencial de multiplicação vagarosa e localizada que se assemelha ao seu tecido de origem é caracterizado como benigno (Alberts *et al.*, 2005).

As primeiras descrições do câncer já datam de 1600 a.C, quando os papiros egípcios já relatavam processos de diferenciação e remoção de alguns tumores, como os de mama, ou de tratamento, como o de útero e estômago. Hipócrates (470-370 a.C) descreveu casos de câncer de mama, útero, estômago, pele e boca, e se referia como sendo a causa principal do excesso de ‘black bile’, oriunda do baço ou estômago, mas não do fígado, fato este que foi sustentado por mais ou menos 200 anos. Galen (138-201 d.C) descrevia o câncer da mesma maneira que Hipócrates e durante séculos esta doença foi considerada como “tumor contra natureza”. Ainda durante a idade média, não houve mudanças conceituais, e os diversos relatos da época mostram que o câncer de útero era o mais freqüente e o câncer de mama poderia ser removido através de intervenção cirúrgica. Somente no século XIV, durante o início do Renascimento, os olhares voltaram-se para os enfermos em um sentido mais amplo, fato este que contribuiu para o exponencial avanço na área médica, culminando no desenvolvimento e aprimoramento das especialidades cirúrgicas e anatomia patológica, dando ao câncer a uma descrição mais científica. Cria-se então, a necessidade da racionalidade científica na compreensão de eventos paliativos, e no século XVIII, na

França e Inglaterra foram fundados os primeiros hospitais especializados no tratamento do câncer. Fatores de risco já começam a ser evidenciados e o primeiro relato pode ser evidenciado por Ramazzini, em 1700, o qual associou a maior incidência do desenvolvimento de câncer de mama às freiras, e associou este evento ao celibato. John Hill (1716-1775) associou o desenvolvimento do câncer vinculado ao tabaco e Percivall Pott descreveu em 1775 o primeiro caso de câncer de origem ocupacional, na qual associou aos limpadores de chaminés inglesas a maior incidência de câncer de escroto. Outras observações e estudos mais aprofundados também contribuíram para o desenvolvimento científico do câncer durante o século XVIII e XIX. Entre 1830 e 1840, Stanislas Tachou registrou os óbitos ocorridos em Paris, e verificou que o câncer foi responsável por 2.4% do total das causas de morte. Os óbitos registrados envolveram 2161 homens e 6957 mulheres nos quais os órgãos acometidos foram: útero (33%), mama (13%), fígado (6%), estômago (25%), e reto (3%). Entre 1760 e 1839 Domenico Antonio Rigone-Stern registrou os óbitos ocorridos na cidade de Verona e mostrou que o câncer era responsável por menos de 1% das causas de morte. Sua contribuição foi muito importante, pois nessas evidências já iniciam as primeiras associações entre câncer e idade, câncer e processos hormonais, relação inversa entre câncer de mama e útero, fatores sazonais, etiologias e sexo (Shimkin, 1977). Assim, os estudos epidemiológicos descritivos foram utilizados para estudar a magnitude do câncer de interesse, segundo as suas diversas localizações, em diferentes grupos populacionais, dando uma dimensão global ao problema.

Ciclo celular e mecanismo de morte celular

O ciclo celular é um mecanismo básico no qual todas as células se reproduzem, dando origem a duas células filhas, o que implica na duplicação do DNA genômico. Consta de quatro fases seqüenciais muito bem coordenadas e reguladas, sendo: fase G1 (“gap1”, uma fase de preparo com início após a mitose que se caracteriza pela alta síntese de RNA e proteínas); fase S (“síntese”, é a fase onde ocorre a replicação do DNA e ao final desta etapa a célula já se comporta com genoma 4n); fase G2 (“gap2”, é o período de preparo e crescimento celular, entre a replicação do DNA e divisão celular) e a fase M, período que ocorre a divisão celular propriamente dita gerando duas células filhas. As fases “gap” são

muito mais importantes do que simples espaços de tempo que permitem o crescimento celular. Elas são exatamente o tempo preciso para que a célula monitore o ambiente externo e interno, assegurando que as condições são favoráveis para que a célula prossiga no ciclo celular. Porém, o ciclo celular não é um evento ao acaso e assim, pontos críticos de checagem (“check-points”) controlam a progressão do ciclo G1-S-G2-M. Existe na verdade um sistema central de controle com alta adaptabilidade a diferentes condições ambientais e tipos de células específicos. Ele recebe, monitora e integra sinais extra-celulares e ainda tem a capacidade de deter a progressão do ciclo em determinados pontos. Esta importante ação reguladora é realizada através de sinais de retroalimentação negativa (Tyers,2004). Existem pontos de checagem durante o ciclo celular em que decisões quanto á progressão do ciclo se faz necessária, e um deles, é chamado de ponto de restrição, e ocorre em G1, quando as células já adquiriram um comprometimento de replicação do DNA genômico. Este evento é de extrema importância para a viabilidade celular, pois mesmo que o estímulo para a divisão seja retirado, a célula ainda continua o ciclo celular até o DNA estar todo replicado (Alberts, 2005). A passagem pelo ponto de restrição em G1 e progressão ordenada dentro do ciclo celular está relacionada com a expressão de uma diversidade de ciclinas, proteínas expressas em G1 e com função de ativação da atividade de cdks (Cyclin Dependent Kinases), um grupo de serina/treonina quinases citoplasmáticas, as quais fosforilam a pRb. Uma vez fosforilada a pRb se dissocia de E2F, uma pequena família de fatores de transcrição responsáveis pela indução da expressão de genes essenciais à progressão do ciclo celular, deixando-o ativo. Dentre as cdks, podemos citar a cdk1, cdk2, cdk4 e cdk6, e dentre as ciclinas, as mais importantes e mais bem caracterizadas são as ciclinas A,B,D e E. Acredita-se que essas proteínas só funcionem quando complexadas com as cdks (complexo catalítico). A formação do complexo ciclina D:cdk4/6 no início da G1 comanda a passagem pelo ponto de restrição, o primeiro momento crítico após o qual a célula progride para uma nova etapa do ciclo celular e assim torna-se crucial a formação desse complexo para a progressão até metade da G1. A ciclina E: cdk2 parece estar envolvida pela transição da fase G1 para S, a ciclina A:cdk2 governa a progressão da fase S e a complexação da ciclina E com cdc2 a transição de G2 para M. Além disso, as atividades desses complexos podem ser conferidas pela regulação de fosforilação e desfosforilação, sendo exemplificados pelo H:ckd7, também chamada de quinase ativadora de cdk ou CAK

(cdk activator kinase) que fosforila D: cdk4/6 e a desfosforilação da ciclina B:cdc2 na fase G2, catalizada pela fosfatase cdc25, permitindo a transição para fase M (Alberts,2005). Outros pontos de checagem do ciclo celular atuam no controle da replicação do DNA, quando a replicação foi incorreta ou incompleta. Ocorre uma parada no ciclo celular até que os erros sejam reparados ou é induzido mecanismo de morte celular (apoptose), dependente de p53 (Pardee, 1989).A apoptose é um mecanismo de morte celular que possibilita um equilíbrio no sistema, e ocorre através de um processo fisiológico ou programado. É uma forma de morte ativa e é caracterizada principalmente pela contração do citoplasma celular, reorganização nuclear, formação de corpos apoptóticos, ativação de endonucleases e fragmentação da cromatina. Para sua ativação, ocorre a clivagem de proteínas vitais intracelulares, que são matérias primas para um grupo de proteases denominado de caspases (cytosolic aspartate- specific cysteine proteases [Rudel & Bokock,1997]). Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo, e clivam substratos que possuem resíduo de ácido aspártico em seqüências específicas. Permanecem em estado de latência e desativadas até que um sinal intracelular específico (físico, químico, hormonal) seja disparado, iniciando uma cascata de eventos onde outras caspases são ativadas para atividades proteolíticas específicas. Uma gama de estímulos pode induzir a apoptose, tais como estresse oxidativo, peróxido de hidrogênio, agentes anti-neoplásicos. Evidências atuais sugerem que existem várias rotas distintas para a ativação das caspases, dependendo do estímulo que desencadeia o mecanismo de morte. Em geral, duas vias distintas podem ser ativadas. A primeira foi citada acima, e a segunda procede através da via de receptores de morte, tais como Fas (CD95+ ou Apo-1) e TNF-R1 (receptor do fator de necrose tumoral) que recrutam caspases 8-10 para o complexo. Ocorre uma participação mitocondrial com alterações na permeabilidade da membrana e liberação de citocromo c para o citosol. O citocromo c se liga ao dATP, Apaf-1 e pró caspase 9, formando o apoptossomo. A caspase 9 (iniciadora e ativa) pode então clivar caspases efetoras em cascata, tais como 2,3,6,7,8 e 10. Portanto, a ativação da caspase 9 mediada pelo citocromo c serve como um mecanismo de amplificação de sinais durante o processo apoptótico (Li *et al.*, 1997; Slee *et al.*, 2009). As células cancerosas podem crescer desordenadamente devido a desequilíbrios associados à proliferação, regulação do ciclo celular e à maquinaria de ativação dos mecanismos apoptóticos. Mutações no genoma que resultam em proteínas não

funcionais pró-apoptóticas ou na expressão exacerbada de proteínas anti-apoptóticas formam a base molecular que permite o desenvolvimento de tumores.

Resposta Imunológica a tumores

Nas últimas décadas, a imunologia de tumores tem se tornado uma disciplina objetiva na identificação de antígenos específicos tumorais reconhecidos por anticorpos e células T. Estes resultados sugerem que o sistema imune naturalmente possui habilidade de reconhecer células tumorais e ainda de controlar o crescimento maligno. O reconhecimento básico ou “immunosurveillance” permite que alguns tumores iniciais não se desenvolvam embora outros, mais agressivos, ultrapassem a capacidade de defesa do organismo, e formam o câncer primário e metastático. Os mecanismos básicos representam aqueles da imunidade inata mediada por células dendríticas, macrófagos, células NK e NKT, além de numerosos mediadores solúveis entre os quais ressaltam as citocinas, em particular o IFN- γ (Shankaran et al., 2001). O reconhecimento em tumores de antígenos modificados, neoantígenos ou antígenos hiper-expressos, com funcionalidades diferentes das células normais, leva a indução de uma resposta imune específica chamada adaptativa (resposta celular e humoral, mediada por linfócitos T e linfócitos B, respectivamente). Essa resposta efetora induzida contra um determinado tumor em processo de desenvolvimento, não é suficiente em grande número de casos devido a um processo de seleção de variantes celulares não susceptíveis aos fatores imunes antitumorais produzidos, um mecanismo denominado de immune editing, o qual é de fundamental importância no microambiente tumoral (Dunn *et al.*, 2004).

As células dendríticas (CDs) desempenham uma extraordinária capacidade de induzir, sustentar e regular a ativação de células do sistema imune e assim coordenar a prevenção dos tumores pelos seguintes motivos: os tumores são repletos de antígenos, os quais são captados e apresentados pelas CDs através de “cross-priming”; as CDs representam um elo importante entre imunidade inata e adaptativa, pois estão associadas a

respostas efectoras tanto de células NK e NKT como de linfócitos T-CD4+ helper e T-CD8+ citotóxicos (Bevan, 2006).

O papel dos macrófagos na imunidade antitumoral foi bem caracterizado *in vitro* mostrando-se que, quando devidamente ativadas, produzem fatores como IFN- γ , óxido nítrico (NO), liberação de enzimas lisossômicas, intermediários reativos de oxigênio (ROI) e TNF- α . Além disso, foi demonstrado que os mecanismos efetores dos macrófagos possuem uma seletividade antitumoral mais eficiente quando comparado a células normais (Abbas, 2008).

Células NK (natural killer) são potentes efectoras do sistema imune inato que estão envolvidas principalmente na lise de células tumorais. Sua função citolítica é regulada pelo balanço de sinais ativadores e inibitórios, os quais são transmitidos por receptores de membrana após a complexação íntima de seus ligantes. Moléculas de MHC classe I são capazes de inibir a ligação de células NK à célula alvo. Um dos mecanismos de escape de células tumorais é exatamente a não expressão de moléculas de MHC classe I e com isso a ausência de apresentação de peptídeos antigênicos a células efectoras T-CD8+ específicos, na tentativa do não reconhecimento da célula tumoral por outras células do sistema imune. Contudo, isso estimula a reatividade com células NK que são capazes de reconhecer esse “silenciamento espontâneo de escape” e ativar o mecanismo de lise (Rankin *et al.*, 2003). Alguns tumores expressam determinados receptores, tais como MICA, MICB e ULB, os quais são ligantes para o receptor ativador NKG2D nas células NK. Além disso, as células NK podem ser direcionadas para as células revestidas por anticorpos da classe IgG pelos receptores Fc (FcR γ III ou CD16). A capacidade tumoricida das células NK é aumentada pelas citocinas incluindo interferons, IL-12 e IL-2. Estudos *in vitro* destacam que células NK ativadas por IL-2 (LAK) quando transferidas adotivamente demonstram resultados anti-tumorais relevantes (Abbas, 2008). Markel *et al.* (2002) descreveram um novo mecanismo de inibição da citotoxicidade das células NK interagindo com uma linhagem de melanoma que não expressava moléculas de MHC classe I. Essa inibição era mediada pela interação homotípica de CD66a expressa em ambas células NK e de melanoma.

Uma relação direta entre células dendríticas (DCs) e NK foi estabelecida (Fernandez *et al.*, 1999). Em camundongos com tumores MHC classe I-negativos, DCs transferidas adotivamente estimularam células NK a exercer efeitos anti-tumor. Aparentemente um

contacto célula-célula entre DCs e células NK foi necessário para incrementar nas últimas, atividades citolítica e de produção de IFN- γ .

As células NKT são linfócitos incomuns, pois são células que expressam alguns marcadores de células NK (imunidade inata) e tem a capacidade de reconhecer antígenos glicolipídicos apresentados por molécula MHC-like denominada CD1 a um receptor de células T (TCR) invariante, V α 14J α 281 em camundongos e V α 24J α Q em humanos. Em resposta à ligação com o TCR, as células NKT do tipo I produzem citocinas pro - inflamatórias de perfil Th1, tais como IFN- γ e IL-2 que auxiliam os mecanismos anti-tumorais (Smith and Godfrey, 2000).

A participação da resposta adaptativa mediada pelos linfócitos B e subsequente produção de anticorpos é responsável pelas reações de neutralização Ag-Ab e pelo mecanismo de citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC). Uma vez que os anticorpos se ligam às células tumorais, células como macrófagos e NK são dotadas de receptores que reconhecem a porção Fc das imunoglobulinas e assim, medeiam o reconhecimento e destruição de células alvo (Staquicini, *et al.*, 2008). Outro mecanismo mediado pelos anticorpos é a ativação do sistema complemento (Abbas, 2008). Em nosso laboratório, metodologias que visam terapias para o tratamento de melanoma são constantemente examinadas, como no caso da obtenção de anticorpos monoclonais contra antígenos do melanoma murino B16F10. Em um desses trabalhos, camundongos C57BL/6 foram imunizados com células do melanoma murino B16F10-Nex4 singênico, obtendo-se anticorpos IgG e IgM com atividades anti-tumorais *in vitro* e *in vivo* (Dobroff, *et.al.*, 2002; Dobroff et al., 2010).

Em geral, células T CD4+ helper não são dotadas de mecanismos efetores voltados para citotoxicidade direta contra os tumores, porém quando as células do tipo Th1 são ativadas podem liberar TNF- α e IFN- γ , aumentando a expressão de moléculas de MHC classe I e a sensibilidade à lise por CTLs das células tumorais (Abbas *et al.*, 2008). Além disso, o IFN- γ produzido por estas células apresenta uma ação direta sobre as células tumorais (Rodrigues et al., 2003). As células T CD8+ citotóxicas (CTLs) são as mais freqüentemente citadas como principais efetoras da resposta imune específica antitumoral (Zhang & Huang, 2008), embora, dependendo do modelo estudado, as outras populações

celulares do sistema imune tenham participação importante na eliminação das células tumorais.

Estudos demonstram que linfócitos T-CD8+ derivados do infiltrado tumoral, expandidos *in vitro* e transferidos adotivamente, tem a capacidade de melhorar a resposta antitumoral em humanos após depleção de linfócitos através de quimioterapia (Rosenberg & Dudley, 2004). Foi mostrado também que, após transferência autóloga de linfócitos T periféricos geneticamente modificados com vetor retroviral contendo genes de TCRs reativos com quatro antígenos associados ao tumor (TAA), altos níveis destes linfócitos circulantes foram detectados um ano após o procedimento. Ainda nesse estudo, alguns pacientes demonstraram uma regressão das lesões metastáticas de melanoma (Morgan *et al.*, 2006).

Várias características dos antígenos tumorais e das respostas imunológicas aos tumores são fundamentais para a compreensão da imunidade tumoral e para o desenvolvimento de estratégias de imunoterapia contra o câncer (Abbas *et al.*, 2008). Portanto, as alternativas terapêuticas mostram-se de grande importância e diversos tipos dessas têm sido testados, sejam elas com células dendríticas, mecanismos mediados por anticorpos, transferência adotiva de células, embora nenhuma das estratégias propostas foi aprovada para uso em tratamento clínico até o momento (Gray-Schopfer *et al.*, 2007).

Melanoma, incidência e desafios

O melanoma é um tumor de origem neuroectodérmica resultante da proliferação e transformação maligna dos melanócitos, os quais se originam de células precursoras na crista neural que então migram para a pele, retina, meninges, mucosas e folículos capilares da 12^a a 14^a semana do processo embriogênico, e se apresentam como células especializadas responsáveis pela produção de melanina (utilizando tirosina como precursor). Os melanócitos são encontradas na camada basal da epiderme, na retina e nos folículos do cabelo, e sua homeostase é regulada pelos queratinócitos da epiderme (Slominski *et al.*, 2004).

Dentre as neoplasias associadas à pele, o melanoma é a que apresenta o pior histórico de prognóstico. A associação com o seu alto índice de mortalidade deve-se

principalmente ao processo de desenvolvimento e progressão acelerado, os quais culminam com metástases para diversos órgãos, tais como fígado (Hawes *et al.*, 2001), pulmões (Rodolfo *et al.*, 2004), cérebro (Feldman *et al.*, 2004), ossos (Atallah & Flaherty, 2005), ovário (Katz *et al.*, 2005), estômago (McWilliams *et al.*, 2005) pâncreas (Liang *et al.*, 2006) e intestino delgado (Belagyi *et al.*, 2006). Destaca-se como o quinto tipo de câncer mais freqüente nos Estados Unidos, com taxas de incidência e mortalidade crescentes, as quais de 1973 a 1994 aumentaram 120,5% e 38,9% respectivamente (Hall *et al.*, 1999). Segundo Rigel *et al.*, 1996 neste mesmo País, é o tipo de câncer mais comum entre mulheres de 25 a 29 anos e o segundo mais comum entre 30 a 34 anos, depois do câncer de mama.

Segundo a IARC (International Agency for Research Cancer). Em todo o mundo, durante todo o ano de 2002, ocorreram 160.000 novos casos de melanoma com 40.000 óbitos. Na Austrália, em muitos países europeus e na América do Norte houve um aumento de 5% ao ano nos casos de melanoma em 40 anos (Thompson *et al.*, 2005). Segundo a AIHW (Australian Institute of Health and Welfare), a Austrália foi o País com maior incidência mundial de melanoma em homens e o segundo em mulheres. No Brasil, segundo as estimativas do INCA para 2008, a incidência foi de um total de 6.120 novos casos de melanoma, sendo 2.950 casos entre os homens e 2.970 entre as mulheres. A região com maior porcentagem foi a região Sul do País (INCA 2008). Cerca de 90% dos casos de melanoma afetam a pele, 5,3%, os olhos 2,2%, apresentam local primário indeterminado e 1,3% afetam as mucosas, dos quais 55,4% ocorrem na região de cabeça e pescoço. Os melanomas primários da cavidade oral são raros e correspondem a menos de 1,2 casos em cada 10 milhões de pessoas por ano, afetando mais comumente o palato, seguido pela gengiva, mucosa jugal, lábios e rebordo alveolar (Hicks & Flaitz, 2000).

A razão do crescimento acelerado do melanoma é, aparentemente, uma soma de alterações celulares em diferentes mecanismos que controlam o ciclo celular, por exemplo, as mutações em moléculas reguladoras tais como p53, proteína chave responsável pela supressão do tumor (Levine, 1999), proteção aumentada contra a apoptose, produção excessiva de fatores de crescimento autócrinos e citocinas, como bFGF e MGSA “melanoma growth stimulatory activity”, proteases que degradam a matriz extracelular, resistência a fatores de inibição exógena, alteração ou aumento na expressão de receptores

para fatores do crescimento exógeno e/ou fatores de crescimento do melanoma sem função autócrina aparente, tais como PDGF A, B e, TGF- β que podem alterar o crescimento do melanoma no microambiente tecidual estimulando fibroblastos normais, células endoteliais ou queratinócitos a produzirem fatores de crescimento. Além disso, existe uma intrínseca associação de mecanismos de expressão de certos oncogenes e inativação de genes supressores. Dentre os genes associados à progressão do melanoma podemos citar aqueles que codificam proteínas controladoras do ciclo celular, como p16 (CDKN2A), localizado no cromossomo 9p21 e responsável pela expressão das proteínas p16INK4a e p14ARF (Walker *et al.*, 1998; Chin *et al.*, 2003). Essa proteína é responsável pela inibição da formação de um complexo enzimático denominado DK4/CDK6/ciclina D, essencial para a fosforilação da proteína Rb (proteína do retinoblastoma) e subsequente entrada da célula na fase S do ciclo celular. A p14ARF tem como função estabilizar a proteína p53, prevenindo sua ação mediada por hMD-2. Na ausência de p14 ARF, a proteína hMD-2 (ligase de ubiquitina específica para p53) conduz p53 à degradação pelos proteassomos (Kamijo *et al.*, 1998). Outra alteração associada à etiologia do melanoma ocorre no gene CCND1, localizado no cromossomo 11q13 e responsável pela expressão da ciclina D1, que atua regulando positivamente o ciclo celular (Utikal *et al.*, 2005). Mutações nos genes que codificam as proteínas da família *ras* e as serina/treonina quinases *raf*, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF/SF) e seu receptor c-MET, assim como as proteínas supressoras tumorais PTEN, p53, p27Kip1 e p21 também já foram descritas em melanomas (Chin, 2003; Chudnovsky *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Assim, cada etapa do desenvolvimento tumoral é marcada por uma gama de variáveis, as quais levam essas células a adquirirem um fenótipo altamente adaptativo. É nesse contexto adaptativo que as células do melanoma expressam uma variedade de moléculas de adesão e proteínas intracelulares que auxiliam na rápida proliferação, aquisição de neovascularização, ou seja, angiogênese tumoral através da secreção do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e seus receptores com domínio quinase (VEGFRII/KDR) e tirosina quinase (VEGF/F1t-1) (Mc Cormick 1999) e em situações mais avançadas processos de invasão e metástase (Hahn e Weiberg, 2002). Cerca de 90% das lesões do melanoma surgem na pele (Balch *et al.*, 1993) e apesar de representar apenas 5% das ocorrências de câncer e pele, o melanoma é o mais agressivo de todos os tipos, devido a sua alta capacidade angiogênica e

metastática. De acordo com o Modelo de Clark (uma correlação do nível anatômico da invasão associada ao nível mitótico), o início e a progressão do melanoma são acompanhados por uma série de mudanças histológicas (Figura 1), classificadas em cinco diferentes estágios: (1) Nevo, lesão benigna caracterizada pelo agrupamento dos melanócitos; (2) Nevo displásico, caracterizado pelo arranjo randômico e descontínuo dos melanócitos; (3) Fase de crescimento radial, com proliferação celular intraepidérmica; (4) Fase de crescimento vertical, na qual os melanócitos penetram através da membrana basal em direção à derme e tecidos subcutâneos; e (5) Metástase, caracterizada pela dispersão do melanoma para outras áreas da pele e outros órgãos, tais como fígado, pulmão, ossos e cérebro (Chudvnoski *et.al.*, 2005; Dahl & Guldborg, 2007).

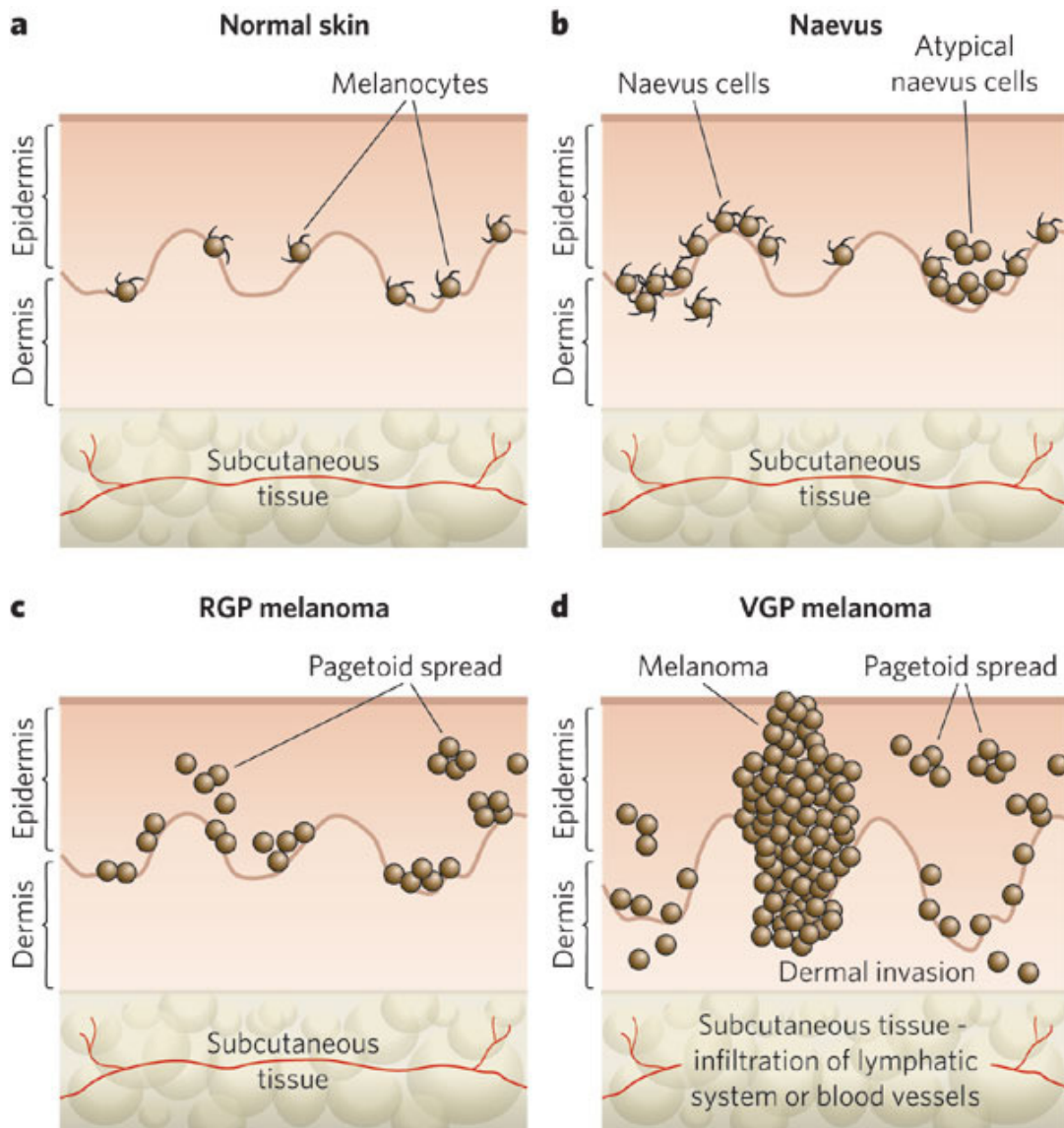


Figura 1: Progressão e transformação dos melanócitos. O melanoma é fruto de uma transformação maligna dos melanócitos, células especializadas oriundas da crista neural, responsáveis pela produção de melanina, as quais migram para a pele durante a embriogênese e em condições normais limitam-se a camada basal da epiderme. Existem vários estágios associados ao processo de diferenciação melanocítica, cada qual marcada por novos clones celulares com vantagens sobre o crescimento dos tecidos circundantes. Assim, os melanomas são classificados histologicamente de acordo com a sua localização e fase de evolução. **A.** pele normal, mostra uma distribuição uniforme dos melanócitos dendríticos na camada basal da epiderme. **B.** Nevo, sendo que nos estágios iniciais os nevos melanocíticos benignos não possuem alteração displásica, e são acompanhados pelo aumento do número de melanócitos dendríticos, e de acordo com a sua localização são denominados de nevos juncionais, cutâneos ou compostos. Alguns nevos são displásicos morfologicamente atípicos aos melanócitos. **C.** Fase de crescimento radial (RGP) já é considerado o estágio primário maligno, pois há um comprometimento funcional dos nevos displásicos com alterações na estrutura e arquitetura atípica. **D.** Fase de crescimento vertical (VGP) já é considerado potencialmente maligno e direciona ao

melanoma metastático, devido o seu potencial invasivo vascular e linfático (retirado de Schopfer-Gray; Wellbrock e Marais, 2007).

O principal objetivo na terapia do câncer é a erradicação das células cancerígenas sem que haja uma injúria dos tecidos normais. Estudos demonstram que as células tumorais ou associadas possuem um grande número de moléculas em sua superfície com expressão aumentada (Ruoslahti, 2002; St. Croix *et.al.*, 2000), bem como outros fatores, tais como a biossíntese alterada e neoantígenos. Metodologias capazes de identificar marcadores ou ligantes específicos são necessárias para o desenvolvimento de ferramentas que direcionam diretamente às células tumorais (Shadidi *et.al.*, 2003).

Atualmente, as medidas terapêuticas aprovadas para o melanoma incluem a quimioterapia com Dacarbazina, Cisplatina, Carmustina, Paclitaxel e Termozolomida (Zitvogel *et.al.*, 2008). A quimioterapia clássica pode ainda ser associada com drogas imunoterápicas, tais como Interferon- α (IFN- α) e Interleucina 2 (IL-2). Ambas têm demonstrado uma atividade antitumoral em casos avançados de melanoma. Embora o IFN- α geralmente forneça um excelente controle, somente 10% dos pacientes respondem com a regressão do tumor. Entretanto, mesmo com a associação de diversas drogas, o prognóstico de sobrevida média ainda é de somente poucos meses (Parmiani *et al.*, 2007).

A imunoterapia para o melanoma tem se tornado um desafio significativo desde a primeira tentativa de tratar pacientes com altas doses de IL-12. Assim, estratégias que aumentem a imunidade antitumoral através da vacinação, imunidade do hospedeiro e a transferência adotiva de células são procedimentos em investigação. O potencial imunoterápico foi primeiramente documentado por William Coley, em 1890, quando produtos bacterianos (Coley's toxins) foram administrados em pacientes que não poderiam ser submetidos a cirurgia para remoção de câncer. Esse potencial de imunoterapia foi ignorado até boa parte do século XX, quando estudos mais detalhados demonstraram a indução de proteção e regressão do melanoma. Em 1980, linfócitos ativados por lectinas e IL-2 demonstraram ser alvos de células tumorais *in vitro*, e citocinas exógenas começaram a ganhar um espaço investigativo, posteriormente sendo produzidos em larga escala, a fim de serem aplicados em clinical trials para melanoma metastático (Kirkwood e Ernstoff, 1985).

O sucesso da imunoterapia para o melanoma confronta-se com algumas variáveis inerentes ao tumor, tais como mecanismos de evasão, moléculas relacionadas às vias de sinalização e a baixa imunogenicidade, em parte pela tolerância aos antígenos “self” compartilhados com células normais. Um aspecto dessa baixa imunogenicidade é o fato de que o melanoma tem a capacidade de inibir a maturação de células apresentadoras de antígenos, prevenindo a completa ativação de linfócitos T e assim regulando negativamente os mecanismos efetores de uma resposta antitumoral efetiva (Kirkwood *et.al.*, 2009). Assim, há uma urgente necessidade de novas terapias, as quais num primeiro momento quebrem a tolerância inicial imposta pelos processos de seleção e elementos reguladores do tumor, promovendo uma resposta antitumoral efetiva e específica contra o melanoma. Algumas dessas estratégias já são realizadas atualmente, tais como o tratamento com agonistas de TLR9 (toll like receptor 9) e o bloqueio de marcadores celulares que realizam papéis fundamentais na regulação de uma resposta imune. Esta estratégia de inibir a molécula reguladora para geração de uma resposta antitumoral efetiva foi ensaiada com a infusão de anticorpos monoclonais para CTLA-4 (molécula coestimuladora que exerce o papel de regular negativamente a ativação e indução de células T) em camundongos, aumentando-se a imunidade antitumoral e a regressão do volume tumoral (Shen, *et al.*, 2004; Menard et al., 2008).

Em geral, os estudos na área da imunoterapia têm se preocupado em mimetizar fenômenos relacionados à imunidade frente aos patógenos, incluindo a captura e o processamento de antígenos; apresentação de antígenos através do MHC classe I e II; sinalização via PAMP's (pathogens associated molecular determinants) através de TLR (toll-like receptors), incluindo lipopolissacarídeos, dupla fita de DNA contendo regiões não metiladas CpG; aquisição da capacidade migratória em direção aos órgãos linfóides e mais importante ainda, regulação positiva de receptores coestimuladores e secreção de citocinas. Porém, as armas do sistema imune inato e adaptativo para uma resposta efetora e um coordenado funcionamento não se baseiam somente na montagem de uma resposta imune robusta, mas também incluem alguns mecanismos de controle, o que evita uma resposta prolongada e desnecessária, evento que pode acarretar danos celulares e sistêmicos. Assim, o sistema imune “desenvolveu” um elaborado sistema de atenuação, o qual exerce a função de feedback negativo desses mecanismos, visando o equilíbrio de uma resposta. Cinco

exemplos clássicos amplamente estudado de moléculas que realizam esse feedback negativo são: em células T, as fosfatases CD45 e ubiquitina ligases Cbl/b, as quais atenuam a resposta em nível de receptor (TCR); CTLA-4 e PD-1 fornecem sinais coestimulatórios negativos em diferentes estágios da ativação de células T e em outras células proteínas denominadas SOCS (Suppressor of cytokine signaling) (Gilboa, 2004).

Microambiente e escape tumoral

A relação entre sistema imune e sobrevivência tumoral é um processo dinâmico dependente do microambiente. O sistema imune é capaz de conter o estabelecimento de um processo tumoral, porém, com o passar do tempo, pressões seletivas tornam as células do sistema imune um aliado do desenvolvimento e progressão tumoral. Essa manipulação em prol do tumor, baseada na alteração fenotípica e sistêmica de uma resposta é a chave para a compreensão dos mecanismos de uma resposta não efetora.

Heterogeneidade e plasticidade são características marcantes das células da linhagem monocítica-macrofágica. Dependendo do microambiente e em resposta a determinadas citocinas, os fagócitos mononucleares podem ter propriedades funcionais polarizadas, referidos como M1 e M2. Classicamente, macrófagos ativados M1 são induzidos por IFN- γ ou TNF- α . Já citocinas de caráter imunossupressor como IL-4, IL-10 e IL-13 induzem uma forma alternativa de macrófagos, denominada M2. O fenótipo dos macrófagos M1 caracteriza-se pela alta expressão de IL-12 (high), alta expressão de IL-23 (high) e baixa expressão de IL-10 (low). São células eficientes na produção de espécies reativas de oxigênio e intermediários oxidados de nitrogênio, além de outras citocinas inflamatórias tais como IL-1, TNF- α e IL-6. Além disso, os macrófagos M1 são potentes indutores e potencializadores das respostas Th1 e contribuem contra progressão primária dos tumores. Por outro lado, os macrófagos M2 compartilham um fenótipo IL-12 low, IL-23 low e IL-10 high, com uma variável capacidade de produzir citocinas inflamatórias. Macrófagos M1 e M2 são dotados de um repertório antagônico de padrão e ativação de citocinas e em geral, M2 induzem e polarizam o repertório Th2 e assim, promovem o estabelecimento e progressão do tumor, reparo e remodelamento tecidual. Nesse contexto,

em um microambiente tumoral, células de origem mielóide imaturas, presentes nos órgãos linfóides e tecidos neoplásicos, assim como os macrófagos associados ao tumor adquirem o fenótipo M2 e assim polarizam as reações que favorecem o estabelecimento do tumor assim como o desenvolvimento e progressão tumoral, por secretar quimiocinas inflamatórias como CCL2, CSF1 e fator de crescimento endotelial vascular A, os quais promovem a inflamação, remodelamento tecidual e angiogênese. Estratégias terapêuticas que limitem a angiogênese já foram descritas como atenuadores do recrutamento de células com o fenótipo M2 no microambiente tumoral (Mantovani *et al.*, 2008).

Cabe salientar, que mesmo os fatores classicamente antitumorais em um primeiro momento e das condições ditadas pelo microambiente tumoral, se comportam de maneira ineficaz e pró tumorigênica. Exemplos desse mecanismo são: IL-2 tem a função relacionada com a expansão clonal de células T, mas no ambiente tumoral pode se comportar também como estímulo pró-apoptótico para células T ativadas; IFN- γ , uma citocina primordial de perfil Th1 e com ação antitumoral, pode induzir a expressão de ligantes inibitórios para células T e NK, inibição da angiogênese (pela indução de fatores de crescimento promotores de metástase mediada por hipóxia) e citotoxicidade mediada por radicais livres liberados por macrófagos (inibitórios para células T). Além disso, o tumor é capaz de induzir de forma direta ou indireta células T regulatórias (Tregs), as quais apresentam um fenótipo CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ que bloqueiam e inativam uma resposta imune efetora antitumoral, pois desencadeiam um processo de anergia (fator direto) através da complexação com receptores CTLA-4 (Yu & Fu, 2006) ou pela secreção de fatores solúveis (forma indireta) tais como IL-10, IL-13 e TGF- β (Knutson *et al.*, 2007). Esses eventos somados prejudicam a eficiência de uma resposta efetora, pois limitam a ação de linfócitos T citotóxicos específicos contra o tumor. Em um ambiente tumoral, os próprios mecanismos de resposta são usados como elementos essenciais no processo de carcinogênese e aquisição de um fenótipo metastático. Em melanomas, a secreção de TNF- α , IL-1, fatores quimioatraentes e de crescimento macrofágico, como CSF1, CCL2 (uma quimiocina originalmente descrita como atraente de macrófagos derivados de tumor), ciclo-oxigenase 2, o principal fator de transcrição inflamatório NF- κ B e enzimas relacionadas ao remodelamento tecidual auxiliam no caráter maligno associado a este tipo de tumor. (Joyce & Pollard, 2009).

Enquanto de um lado temos macrófagos associados ao tumor promovendo o estabelecimento, desenvolvimento e progressão de tumores através da manipulação dos mecanismos da imunidade inata, outra população de células essencial para uma resposta antitumoral também é requisitada. Células dendríticas, ou células apresentadoras de antígenos profissionais, têm a capacidade de modular a imunidade adaptativa, criando um elo importante entre ambas as respostas, e são assim capazes de controlar a ativação das células B e T, NK e NKT, além de serem capazes de induzir a ativação específica de macrófagos M1, contribuindo para uma melhor resposta efetora antitumoral. Assim, estrategicamente as células dendríticas residem em todos os tecidos e fornecem um equilíbrio na captura, processamento, migração aos órgãos linfóides secundários e apresentação de antígenos aos linfócitos específicos. Existem diversas subpopulações de células dendríticas com distintas funções, porém as células dendríticas imaturas (não ativadas) têm a função de induzir o mecanismo de tolerância imunológica por apresentar antígenos próprios a células T, enquanto que células dendríticas maduras desempenham a imunidade específica por promover a ativação, proliferação e diferenciação de células T efetoras. Observações de diversos estudos clínicos têm notado nos ambientes tumorais, infiltrados de células dendríticas imaturas, das quais estão presentes em mais de 90% dos tumores de mama e a presença de 60% de células dendríticas maduras, as quais se concentram nas áreas peritumorais (Mantovani *et al.*, 2008).

Subpopulações de células NKT (tipo II) quando ativadas no ambiente tumoral também podem desencadear uma resposta de perfil Th2 e assim, citocinas tais como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β também podem ser secretadas, aumentando o potencial de imunossupressão das células apresentadoras de antígenos e linfócitos T CD4+ e CD8+ (Smith & Godfrey, 2000). Na imunidade adaptativa, as células T CD4+ podem, por exemplo, secretar citocinas imunossupressoras e inibir a proliferação de linfócitos T, comprometendo a efetividade da resposta antitumoral (Vence *et al.*, 2007).

Foi demonstrado recentemente na UNONEX que os glicosíngolípídeos iGb3 (Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) e seu precursor iGb4 (GalNAc β 1-3Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer) presentes no tumor podem ativar *in vitro* células iNKT, quando apresentados por células dendríticas. A transferência passiva de células dendríticas ativadas

in vitro com os glicosfingolipídeos eliminou o crescimento tumoral in vivo (Dias *et al.*, 2009).

Um dos fatores inerentes ao tumor, é que o próprio mecanismo desencadeado no microambiente pode subverter a função das células dendríticas, e assim, criar um mecanismo de escape de uma resposta imune específica e efetora. Este evento se dá através da polarização da maturação celular, através da ativação de sinais de transcrição tais como STAT3 e aumento da produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estes eventos somados não só induzem a prevenção de uma resposta específica, mas também induzem a tolerância e promovem a angiogênese. Além disso, diversas citocinas podem induzir a supressão de células dendríticas, tais como IL-10 e IL-6 secretadas em alguns tumores humanos (Jäger *et al.*, 2001).

Nosso grupo (UNONEX) também demonstrou em 2008, que a neutralização in vivo da IL-13 por terapia gênica, utilizando uma quimera formada pela cadeia $\alpha 2$ de alta afinidade do receptor de IL-13 e pela porção Fc de uma IgG murina expressa em um plasmídeo eucariótico, foi capaz de retardar o desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2, proteção potencializada por concomitante terapia gênica com IL-12 e quimioterapia com um composto ciclopáladado (Hebeler-Barbosa *et al.*, 2008).

A Figura 2 demonstra exatamente esse complexo mecanismo de manipulação do sistema imunológico dirigido pelo tumor, mostrando que o microambiente é rico em citocinas e outros mediadores inflamatórios que influenciam na imunossupressão, crescimento de células tumorais, remodelamento tecidual e angiogênese.

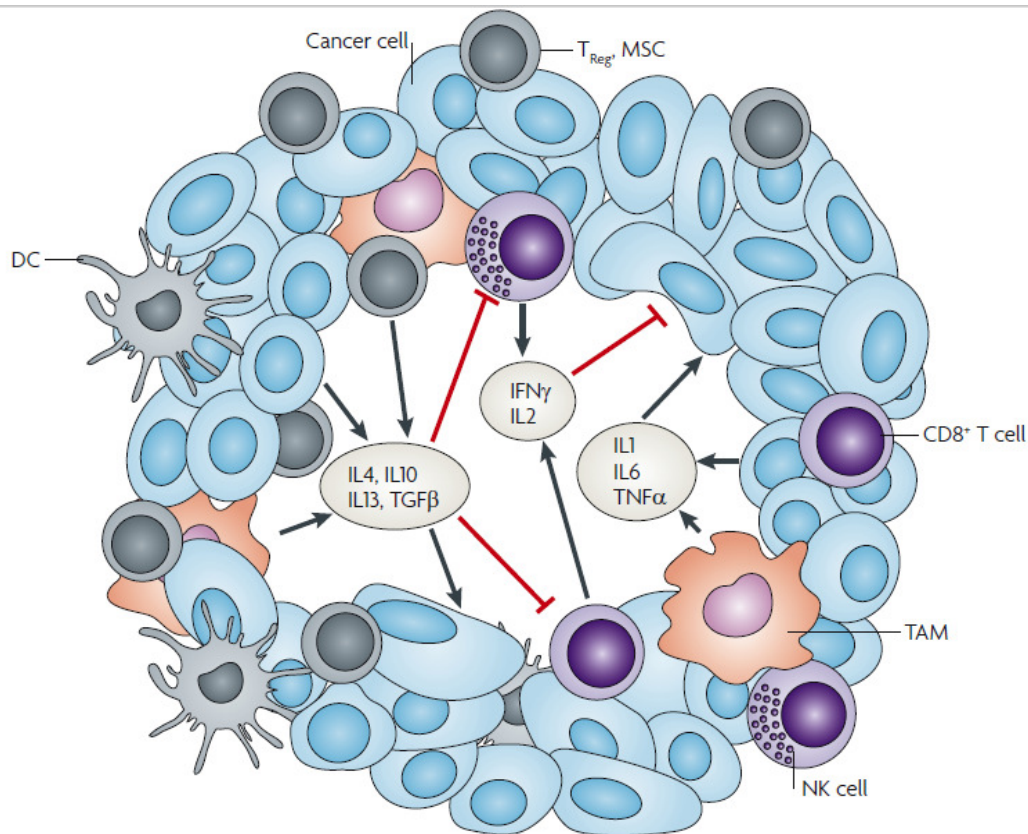


Figura 2: Papel das principais citocinas no microambiente tumoral. Células tumorais podem coexistir com células do sistema imunológico: macrófagos associados ao tumor (TAM), linfócitos T regulatórios (Treg), células dendríticas (DC) e células mielóides supressoras (MSC). TAM e Treg no microambiente tumoral são as principais células que direcionam o padrão de resposta para um perfil Th2, e assim citocinas secretadas no meio como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β tem a capacidade de suprimir a resposta anti-tumoral liderada em um primeiro momento pelas células NK e linfócitos T CD8+. Essa estratégia de ativação do sistema imune em prol do desenvolvimento e progressão tumoral é uma das formas que os tumores adquiriram de lidar com as constantes pressões seletivas e assim se desenvolver (Seruga *et al.*, 2008).

Dentre as alternativas terapêuticas, a imunoterapia baseada em “carregar” células dendríticas com peptídeos semelhantes aos apresentados pelas moléculas de HLA classe I e II é uma estratégia bastante usada. Além disso, a vacinação com imunomoduladores recombinantes (co-estimuladores e citocinas), exossomos, vetores virais, plasmídeos de DNA, transfecção de RNA, anticorpos opsonizados em células dendríticas, inibição de transdutores de sinais e terapia anti-angiogênica são as mais destacadas (Chudnovski *et.al.*, 2005; Gray-Schopfer *et.al.*, 2007). O conjunto desses “pré-clinical/clinical trials” demonstram que o sistema imune é capaz de rejeitar o estabelecimento do tumor.

Sinalização no melanoma

A compreensão dos fenômenos relacionados aos processos de desenvolvimento e progressão dos tumores vem ganhando um destaque inovador e com perspectivas promissoras. Há cada ano que passa as estratégias para o tratamento de tumores sólidos passam a ser direcionadas a alvos oncogênicos específicos e sua ativação influencia na cascata intracelular. O Trastuzumab (Herceptin®) um anticorpo monoclonal humanizado utilizado no tratamento do câncer de mama liga-se especificamente ao HER-2 (fator de crescimento epidermal humano). O ST1571 (Gleevec®) um inibidor de tirosina quinase com alvo no produto da expressão gênica alterada de BCR-ABL em pacientes com leucemia mielóide crônica, são exemplos de como a compreensão das vias de sinalização podem auxiliar no desenvolvimento de ferramentas específicas para futuros tratamentos. O entendimento de como proteínas reguladoras dos diversos mecanismos do comportamento celular está intimamente ligado, é um desafio para a compreensão das vias de sinalização que culminam em ações celulares específicas. A ativação de vias como RAS/RAF/MAPK torna-se um crítico componente da proliferação e sobrevivência tumoral, evento que também pode ser acompanhado em modelos de melanoma (Colisson, *et al.*, 2003). Durante o processo de transformação oncogênica, células de melanoma escapam dos mecanismos normais de controle do crescimento e adquirem a capacidade de invadir os tecidos adjacentes. Raf é uma serina treonina quinase que tem como uma de suas funções downregular a ação de Ras GTPase. Quando ativada, Raf fosforila MEK que então fosforila ERK. Uma vez ativado, ERK fosforila diversos alvos citoplasmáticos e nucleares, os quais medeiam diferentes ações celulares. Hoje se sabe que em melanomas, tanto B-Raf quanto a proteína Ras estão mutadas em aproximadamente 30% dos melanomas humanos, e assim, por ser uma proteína altamente relacionada à regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, torna-se um marcador essencial da progressão maligna do melanoma humano (Karasarides, *et al.*, 2004). Nos últimos anos cresceu a compreensão do papel de ERK e MAPK no melanoma (Gorden, *et al.*, 2003) e a prova deste fato é a preocupação dos trabalhos em inibir a via das MAPK e B-Raf. Colisson, *et al.*, 2003 demonstrou que a administração oral de uma molécula denominada CI1040, um inibidor de MEK quinase, impediu a formação de metástase pulmonar assim como uma regressão do melanoma

pulmonar em camundongos e Hingorani, *et al.* (2003) suprimiram a atividade de B-Raf e notaram a regressão da transformação do melanoma.

Outra via de sinalização estudada em modelos de melanoma é a participação da Akt, uma proteína que desempenha um importante papel na sinalização do ciclo celular, metabolismo, sobrevivência celular e processos associados à angiogênese. Segundo estudos liderados por Steelman *et al.* (2004), essa via está mutada e super expressa em uma variedade de tumores, sendo que 40-50% estão relacionados nos modelos de melanoma, agindo principalmente no gene PTEN. O produto deste gene codifica uma fosfatase, que tem como função primária a degradação de produtos gerados por PI3K, através da desfosforilação do fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato e fosfatidilinositol 3,4 bifosfato na posição 3. A perda da função da PTEN gera o acúmulo de segundos mensageiros lipídicos, evento que aumenta a atividade de fosforilação da Akt, direcionando a uma diminuição da apoptose e aumento da sinalização mitogênica (Steelman *et.al.*, 2004). A expressão aumentada de Akt tem sido relacionada com pior prognóstico de diversos tipos de tumores, incluindo carcinoma gástrico, hepatocelular, cancer de mama e melanoma. O aumento da fosforilação de Akt e a progressão de modelos de melanoma foram evidenciados por Dai *et al.* (2005), sendo esse aumento relacionado a 17% expresso em nevos normais, 43% expresso em nevos displásicos, 49% expresso em melanoma primário e 77% expresso em melanomas metastático. Uma característica marcante da Akt é a interação intracelular com outros componentes de vias opostas. No trabalho desenvolvido por Dhawan *et al.* (2002) os autores evidenciaram a ativação constitutiva de Akt em melanoma regulando positivamente a expressão do fator de transcrição NF- κ B e este evento está associado com a progressão tumoral. Além disso, o efeito de Akt também está relacionado com a progressão tumoral por auxiliar a motilidade tumoral e conseqüente a invasão celular e a produção de metaloproteases (Kim *et al.*, 2001) e por ser capaz de interferir na evolução da progressão do crescimento radial (RGP) para o crescimento vertical (VGP), favorecendo assim um possível mecanismo de metástase (Govindarajan, *et al.*, 2007).

Uma das vias bem estudadas no desenvolvimento de processos tumorigênicos é a associação da via Wnt, envolvida na estimulação de vias de transdução de sinal envolvidas na proliferação celular, sobrevivência, comportamento e destino celular. Por mais de 20

anos, a oncogenia de moléculas Wnt foi observada em uma série de experimentos aleatórios provenientes da integração proviral em camundongos. A importância da sinalização de Wnt em tumores humanos desde então tem sido reforçada pela identificação de genes que codificam componentes da via Wnt, tais como Axina, APC (*Adenomatous polyposis coli*) e β -catenina (Polakis, 2007). Um exemplo clássico da participação dessas proteínas é o envolvimento da expressão da Wnt5a em biópsias de melanoma humano e o aumento da progressão, motilidade celular e invasão. Nas últimas décadas, outras vias de sinalização em modelos tumorais também ganharam atenção especial, como JNK/c - Jun, JNK/ATF2, JNK/c - Jun e PKC (Veeman *et al.*, 2003).

Vias de sinalização ainda não muito bem descritas no desenvolvimento e progressão tumoral referem-se às vias que culminam na secreção de citocinas. As citocinas desempenham uma série de funções controlando a sobrevivência celular e proliferação. Suas atividades são mediadas por receptores transmembrana que transduzem sinais intracelulares através da complexação e ativação de moléculas efetoras citoplasmáticas. A duração e a intensidade desses sinais são reguladas pela ação de fosfatases e proteínas que induzem a ativação de uma família de inibidores que interferem na sinalização JAK/STAT, denominada de supressor of cytokine signalling – SOCS (Star, *et al.*, 1997).

As proteínas SOCS constituem uma nova família de proteínas que regulam negativamente os sinais de transdução de sinal de citocinas, com sete membros (SOCS1-SOCS7), cada um com tropismo específico em diferentes vias de sinalização. O primeiro membro desta família SOCS-1, também chamada de JAB ou SSI-1 foi clonada em 1997 (Endo *et al.* 1997; Naka *et al.* 1997; Starr *et al.* 1997). Todos os membros são constituídos por um domínio clássico central SH2, um domínio amino-terminal variável (contendo região KIR) e um domínio carboxi-terminal conservado de 40 aminoácidos, conhecido como SOCS-box, cuja função é o recrutamento de um sistema de ubiquitina transferases, os quais interagem com um complexo contendo elonguina B, C, culina-5, RING-box-2 (RBX-2) e ligase E2, as quais medeiam à degradação protéica via proteassomo. Cada representante dessas proteínas é responsável por uma função intracelular específica no mecanismo atenuante da sinalização. A figura 3 demonstra a estrutura e função das proteínas SOCS-1 (Youshimura *et al.*, 2007).

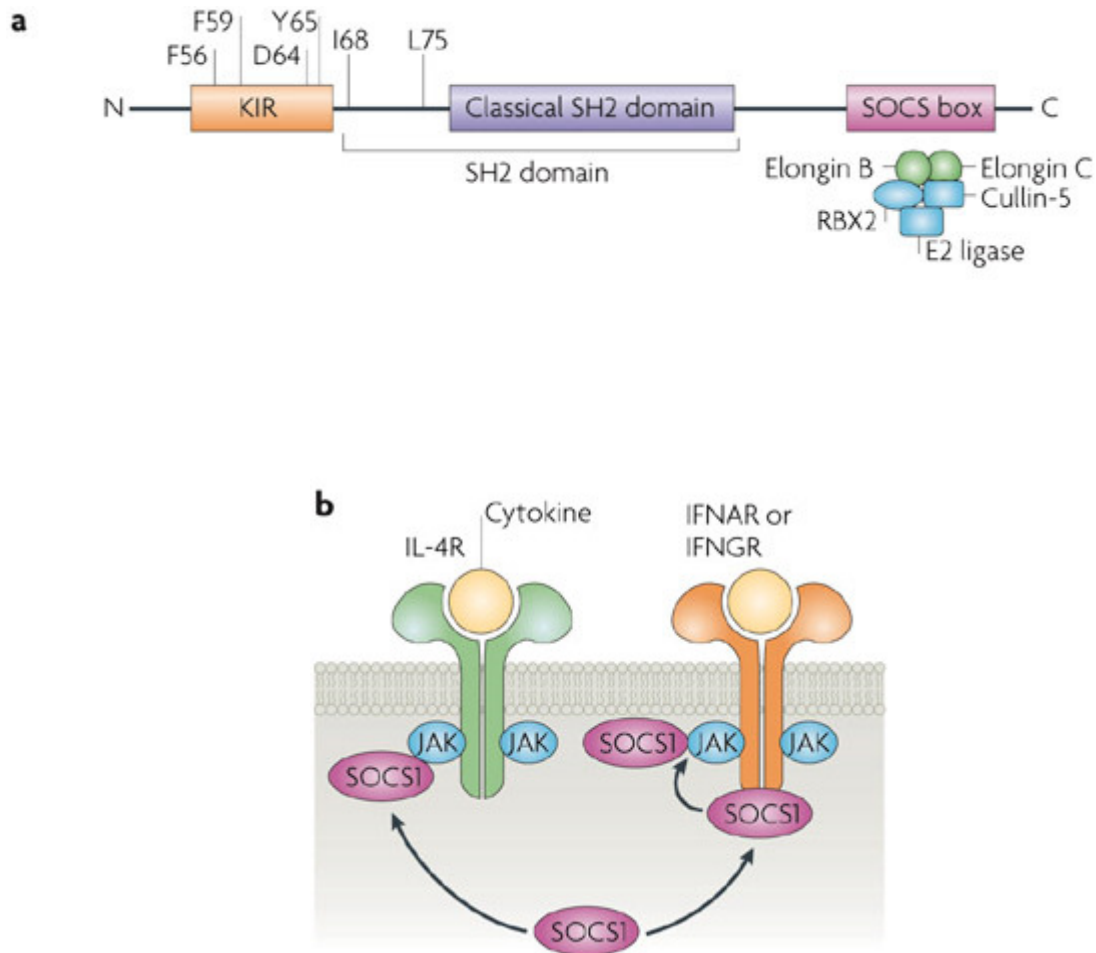


Figura 3: Estrutura e função das proteínas SOCS-1: **a) Estrutura da SOCS1.** A estrutura de SOCS-1, assim como todos os membros dessa família são constituídos por um domínio clássico conservado central SH2, um domínio amino-terminal variável (contendo região KIR) e um domínio carboxi-terminal conservado de 40 aminoácidos, conhecido como SOCS-box, cuja função é o recrutamento de um sistema de ubiquitina transferases, os quais interagem com um complexo contendo elonguina B, C, culina-5, RING-box-2 (RBX-2) e ligase E2, as quais medeiam à degradação protéica via proteassomo. Assim, todo o complexo, proteínas SOCS-alvo do complexo receptor de citocinas, incluindo Janus quinase (JAK), e as proteínas SOCS-1 são direcionadas para degradação proteossômica. Além do mecanismo de ubiquitinação e subsequente degradação de proteínas, tanto SOCS1 e SOCS3 podem inibir a atividade direta da tirosina quinase de JAK pois contêm uma região quinase inibitória (KIR) situado em seguida ao domínio SH2 central, que se propõe a funcionar como uma pseudosubstrate. SOCS1 inibe a atividade catalítica de Jaks ligando-se o ciclo de ativação do domínio catalítico através de KIR e seus domínios SH2. A inibição da atividade quinase por KIR

é o mecanismo mais importante de supressão SOCS1 e SOCS3, como mutações pontuais nessa região são capazes de abolir completamente o efeito inibitório da SOCS1 e SOCS3 sobre a sinalização de citocinas. **b) O papel do domínio SH2 da SOCS1.** SOCS1 podem interagir diretamente com a ativação de JAK kinase, mas também tem afinidade com os receptores de interferon (IFN). Portanto, SOCS1 podem ligar aos receptores de IFN primeiro, e então interagir com Jaks.

A função de SOCS-1 tem sido estudada por se tratar de uma proteína que regula negativamente a sinalização de citocinas, tais como IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, fator inibitório de leucemia, oncostatina e hormônios de crescimento, em células T e outras células. Essa supressão é resultante da intervenção direta na via de sinalização JAK/STAT, através da ligação do domínio SH2 (KIR) na alça de ativação de JAK, o qual se liga diretamente às tirosinas da quinase Jak2 e assim inibe a atividade das quinases através da oclusão do sítio de ligação dos substratos, surgindo assim como um mecanismo de feedback negativo dessa via. Assim, a SOCS-1 está relacionada por sua habilidade de regular negativamente a regulação de citocinas e a sinalização de fatores de crescimento.

Outra função desempenhada pela SOCS-1 é a sua capacidade de inibir a atividade de KIT (receptores de tirosina quinase). Este mecanismo está associado pela sua habilidade em se complexar, através do domínio SH2, em uma região não catalítica denominada de “kinase insert” e assim desestabilizar o fator VAV-1 (fator de troca do nucleotídeo guanina), um importante oncogene relacionado a diversas desordens hematopoiéticas. Além disso, alguns estudos revelam que SOCS-1 forma um complexo multimérico com componentes VCB, E3 ubiquitina ligase, elonguina B e C, através da região C-terminal da SOCS box. Estes indícios levaram os autores a propor um modelo no qual a SOCS-1 funciona como uma molécula adaptadora com a função de recrutamento de moléculas tais como a VAV, a qual é ubiquitinada e direcionada a degradação via proteassomo (Kamura, *et al.*,1998; Zhang, *et al.*,1999; De Sepulveda *et al.*,2000; Tyers & Rottapel, 1999). O processo de transformação celular inclui tanto sinais de ativação de oncogenes como a supressão de sinais inibidores, que normalmente operam para regular a duração e a intensidade dos sinais. O papel de SOCS-1 segundo trabalhos de Rottapel *et al.* (2002) é o de uma molécula reguladora negativa e intimamente associada à inativação de mutações que favorecem o desenvolvimento de desordens hematopoiéticas. SOCS-1 pode inibir a forma oncogênica de VAV e assim inibir a proliferação induzida pelas formas oncogênicas.

(De Sepulveda *et al.*, al 2000; Rottapel, *et al.*, 2002). Em outro trabalho, os autores revelaram que SOCS-1 suprimiam o crescimento tumoral de células transformadas tanto diretamente pela via oncogênica como através da inibição do receptor KIT através da fusão protéica denominada TEL-JAK2. Esta fusão é resultante da translocação cromossômica de t(9;12)(p24; p13) que direciona a justaposição do fator de transcrição TEL com JAK-2. Esta translocação foi originalmente encontrada em pacientes com leucemia mielóide crônica (CML) e leucemia linfóide aguda (ALL) (Lacronique *et al.*,1997; Peeters *et al.*, 1997). O mecanismo de inibição liderado pela SOCS-1 foi distinto entre a inibição de KIT e TEL-JAK2, pois a região SH2 foi essencialmente necessária para inibir TEL-JAK2, enquanto para KIT este domínio foi dispensado. Além disso, SOCS-1 foi capaz de regular diversas vias de sinalização que promovem a proliferação celular de uma variedade de linhagens celulares (Rottapel *et al.*, 2002).

Diversos trabalhos tentam demonstrar a ação de SOCS-1 em diferentes modelos tumorais e diferentes níveis de expressão. Alguns deles demonstram o papel de SOCS-1 como um produto gênico supressor de tumor. Essa função foi atribuída em estudos mostrando que SOCS-1 regulava a sinalização de IL-6 (Lee *et al.*, 2006; Flowers *et al.*,2005). Outros demonstram a participação de SOCS-1 diretamente na malignidade tumoral, como é o caso do trabalho de Li *et al.* (2004). Nesse trabalho os pesquisadores demonstraram, utilizando linhagens de melanoma, que os transcritos de SOCS-1 eram detectáveis tanto em linhagem normal de melanócitos quanto em linhagens transformadas. Porém, a expressão protéica de SOCS-1 só era detectada na linhagem de células transformadas. Foi a partir desses dados de expressão aumentada de SOCS-1 em células transformadas que tomamos como base para a realização de nosso trabalho. Os autores chegaram à conclusão e correlacionaram à expressão de SOCS-1 em células de melanoma humano com o aumento do potencial invasivo seguindo o modelo de Clark, ou seja, quanto maior o nível de Clark apresentado pelos pacientes (Clark IV e V), maior a concentração de SOCS-1 nas amostras *in vivo* e *in situ*. Este trabalho foi de fundamental importância, pois tornou-se um marcador da progressão tumoral de melanoma humano *in situ*. Outro trabalho que evidencia a participação de SOCS-1 em modelos de melanoma, porém com um envolvimento de seu tropismo metastático para o cérebro, é o trabalho publicado por Huang *et al.* (2008). Neste trabalho, os autores detectaram que a expressão de JAK2 foi maior em

células de melanoma que tiveram metástase para o cérebro do que a expressão de SOCS-1, que foi reduzida significativamente. Outro dado importante foi a correlação da expressão de SOCS-1 na linhagem celular A375Br (linhagem transformada RNAi para SOCS-1) e A375P (wild type), e seu achado foi que a expressão de SOCS-1 que se apresentava em concentração reduzida nas linhagens A375Br não foram capazes de reproduzir os efeitos de invasão cerebral quando comparada à linhagem original A375P (células de melanoma primário). O mecanismo pelo qual SOCS-1 inibiu a metástase para o cérebro pode ser atribuído, pelo menos em parte, pela regulação da angiogênese e invasão.

Outro trabalho que coloca SOCS-1 como um supressor de tumor foi desenvolvido por Yoshikawa *et al.* (2001), que evidenciaram que o silenciamento de SOCS-1 regulou o crescimento de carcinoma hepatocelular.

Como podemos evidenciar, a literatura traz resultados bastante diferenciados sob silenciamento de SOCS-1. Porém, o papel do envolvimento das proteínas SOCS-1 na sinalização e resistência tumoral ainda permanece um evento não muito bem esclarecido.

Em relação a uma imunoterapia baseada no aumento de IFN- γ , Takahashi *et al.* (2008) concluíram que o aumento da atividade antiproliferativa dos interferons era mediado pelo silenciamento da expressão de genes das proteínas SOCS em células tumorais.

RNA de interferência (RNAi): Histórico e mecanismo de silenciamento.

A revelação de que as moléculas de RNA eram dotadas de uma atividade catalítica, em meados dos anos 80, já havia alertado que elas provavelmente desempenhassem funções muito mais relevantes do que as de simples mensageiros ou “fábricas de proteínas”. Com o passar dos anos, o RNA passa a ser visto de uma maneira mais ampla e sistêmica, ou seja, como mediador celular principal para o controle do metabolismo. O início da descoberta começou com fatos inusitados e difíceis de explicar, e as primeiras observações tiveram plantas como alvo. Em 1990 um grupo de pesquisadores pretendendo produzir petúnias com uma cor púrpura mais intensa usou como estratégia a adição de cópias adicionais do gene *chalcone synthase* e sob controle de um forte promotor, envolvido na

produção de pigmentos de antocianina. Porém, o evento observado foi completamente paradoxal e ao invés de observarem uma intensificação da coloração desejada, muitas apareceram variegadas e até mesmo totalmente brancas, sem pigmento. Este fenômeno de silenciamento gênico em plantas também foi observado em outros organismos e ficou conhecido “*co-supressão*”, uma vez que a expressão tanto do gene introduzido (transgene), quanto do homólogo endógeno foi suprimida. Esses mecanismos foram descritos por dois grupos distintos (van der Krol *et al.*, 1990; Napoli *et al.*, 1990).

Em 1995, Guo e colaboradores apresentaram um trabalho analisando o gene *par-1* de *Caenorhabditis elegans* (verme nematóide) utilizando a técnica de *RNA antisense*. Nesse trabalho, eles relataram um detalhe intrigante: tanto o RNA antisense como sense (controle) levaram ao silenciamento do gene em estudo (Guo e Kempthorn, 1995). Por volta de 1996 já havia a hipótese que duplas fitas de RNA (dsRNAs) levassem de alguma forma ao silenciamento gênico nas petúnias e fungos, idéia essa que soava como *nonsense* pois era difícil imaginar um mecanismo claro pelo qual isso pudesse acontecer. Contudo Fire *et al.* (1998) (Figura 4) acreditaram nessa hipótese e imaginaram que os experimentos liderados por Guo eram paradoxais exatamente devido a uma contaminação das moléculas de RNA sense com antisense, gerando dsRNAs que levaram ao silenciamento gênico. O que chama a atenção para os experimentos de Fire *et al.* é o fato da observação atenta e a simplicidade com que foram conduzidos.

Assim, o papel da molécula de RNA tornou-se imprescindível e uma nova ferramenta que anos mais tarde seria essencial na biologia molecular denominada RNA de interferência começou a ganhar força e prestígio na comunidade científica.

Conceitualmente, o RNAi é uma técnica que se aproveita de elementos básicos e evolutivamente conservado ao longo das células, pois destaca-se como um mecanismo oriundo da própria maquinaria celular, e é inerente aos processos bioquímicos pré-existentes no organismo, a chamada via de silenciamento gênico pós transcricional (PTGS), que se caracteriza como um mecanismo de defesa que atua reconhecendo e degradando moléculas estranhas de fita dupla no transcriptoma de uma célula viável. Portanto, a estratégia do silenciamento gênico via RNAi é disparado pela introdução de seqüências de RNA de dupla fita (dsRNA) cuja seqüência é específica ao RNA mensageiro alvo que será degradado (Zamore *et al.*, 2000; Bernstein *et al.*, 2001).

As funções de determinados genes agora podem ser elucidadas de maneira mais minuciosa, bem como uma inter-relação entre diferentes vias celulares pode ser mapeada. Muitas vezes, a inativação permanente de determinados genes pela técnica de “animal knock-outs” não é satisfatória, pois esta técnica interfere no comportamento e disposição do DNA, e se nos deparamos com um alvo gênico que é um elemento essencial para a sobrevivência do animal, um alvo sistêmico e inter-relacionado, como por exemplo um gene que afeta o metabolismo celular ou resposta inflamatória, fica difícil o seu silenciamento, pois compromete a integridade dos experimentos. Assim, pela técnica do RNA de interferência, podemos silenciar pontualmente um alvo gênico atuando especificamente naquele determinado padrão celular, sem comprometer um sistema, pois o mecanismo de atuação é pós transcricional. Existem duas maneiras de introduzir o RNAi nas células alvo, sendo que o primeiro é diretamente pela transfecção de pequenos RNAi sintéticos (siRNAi) os quais possuem um efeito transitório ou então, através da introdução de vetores plasmidiais, os quais levam a expressão de RNA dupla fita em forma de hairpins (shRNAi) e são processados pela maquinaria celular através de uma RNA polimerase III denominada de DICER, em siRNAi que ativa o complexo RISC (Figura 5) e uma expressão estável é constituída. Porém, o uso de vetores plasmidiais torna o processo de transfecção um evento limitado, devido a sua baixa transfecção. Para aumentar a eficiência da transfecção utilizando vetores plasmidiais e do silenciamento gênico via shRNAi, o emprego de lentivírus tem ganhado espaço na comunidade científica (Matta *et al.*, 2003; Mittal *et al.*, 2004) e foi a base de nossa construção para o silenciamento contínuo e criação de nossas linhagens.

and 10 Na₂HPO₄. FV solution also contained 0.2 NaF and 0.1 Na₂VO₄. Rarely, irreversible current rundown still occurred with FVPP. The total Na⁺ concentration of all cytoplasmic solutions was adjusted to 30 mM with NaOH, and pH was adjusted to 7.0 with N-methylglucamine (NMG) or HCl. PIP₂ liposomes (20–200 nm) were prepared by sonicating 1 mM PIP₂ (Boehringer Mannheim) in distilled water. Reconstituted monoclonal PIP₂ antibody (Perspective Biosystems, Framingham, MA) was diluted 40-fold into experimental solution. Current–voltage relations of all currents reversed at E_K and showed characteristic rectification, mostly owing to the presence of Na⁺ in FVPP and possibly also residual polyamines. Current records presented (measured at 30 °C, –30 mV holding potential) are digitized strip-chart recordings. Purified bovine brain Gβ₂⁷ was diluted just before application such that the final detergent (CHAPS) concentration was 5 μM. Detergent-containing solution was washed away thoroughly before application of PIP₂, because application of phospholipid vesicles in the presence of detergent usually reversed the effects of Gβ₂; presumably, Gβ₂ can be extracted from membranes by detergent plus phospholipids.

Molecular biology. R188Q mutation was constructed by insertion of the mutant oligonucleotides between the BsmI and BglII sites of pSPORT–ROMK1 (ref. 11). A polymerase chain reaction (PCR) fragment (amino acids 180–391) from pSPORT–ROMK1 R188Q mutant was subcloned into pGEX–2T vector (Pharmacia) for expression of R188Q mutant protein of GST–RKC. The construction, expression and purification of GST–IKC (amino acids 182–428 of IRK1), GST–GKC (180–462 of GIRK1), GST–IKN (1–86 of IRK1) have been described^{1,2,22}.

In vitro PIP₂ binding assay. ³H-PIP₂ in chloroform-methanol (1:1) (American Radiolabeled Chemicals; 0.4 μCi nM⁻¹ specific activity) was dried under N₂ and sonicated in 100 μl phosphate buffered saline (PBS) to form pure ³H-PIP₂ liposomes. Purified GST fusion protein (100 nM) was incubated with ³H-PIP₂ (0.2–1 μM) and precipitated by glutathione 4B-Sepharose beads. After 1 wash with PBS, the precipitates were dissolved in SDS gel loading buffer and counted in a beta-scintillation counter using a window for ³H. The bound ³H radioactivity was typically in the range ~2–8% of the total added. For co-immunoprecipitation, 25% PIP₂ or PIP in 75% phosphatidylcholine (PC) background (30 μg PIP₂ or PIP (Boehringer Mannheim) and 90 μg phosphatidylcholine (Sigma)), both in chloroform, were dried down together and sonicated in 300 μl PBS to form mixed liposome. GST fusion proteins were first incubated with 25% PIP₂ or PIP liposome (100 μM) and PIP₂ antibodies (1:100 dilution) for 2 h and with protein A-Sepharose for a further 30 min. After one wash with PBS, the immunoprecipitates were separated by 10% SDS–PAGE, probed with specific antibodies^{21,22}, and visualized by ECL (Amersham). Each experiment was performed at least twice with similar results. The relative amount of immunoreactivity in each lane was quantified by serial dilutions of sample²¹.

Received 6 June; accepted 13 October 1997.

1. McNicholas, C. M., Wang, W., Ho, K., Hebert, S. C. & Giebisch, G. Regulation of ROMK1 K⁺ channel activity involves phosphorylation processes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 8077–8081 (1994).
2. Fakler, B., Brande, U., Glowatzki, E., Zenner, H.-P. & Ruppersberg, J. P. Kir2.1 inward rectifier K⁺ channels are regulated independently by protein kinases and ATP hydrolysis. *Neuron* **13**, 1413–1420 (1994).
3. Kubo, Y., Reuveny, E., Slesinger, P. A., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* **364**, 802–806 (1993).
4. Dascal, N. et al. Atrial G-protein-activated K⁺ channel: expression cloning and molecular properties. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **90**, 10235–10239 (1993).
5. Krapivinsky, G. et al. The G-protein-gated atrial K⁺ channel I_{K(ACh)} is a heteromultimer of two inwardly rectifying K⁺-channel proteins. *Nature* **374**, 135–141 (1995).
6. Lesage, F. et al. Molecular properties of neuronal G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **270**, 28660–28667 (1995).
7. Furukawa, T., Yamane, T., Terai, T., Katayama, Y. & Hiraoaka, M. Functional linkage of the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel to actin cytoskeleton. *Pflügers Arch.* **431**, 504–512 (1996).
8. Hilgemann, D. W. & Ball, R. Regulation of cardiac Na⁺, Ca²⁺ exchange and K_{ATP} potassium channels by PIP₂. *Science* **273**, 956–959 (1996).
9. Fukami, K. et al. Antibody to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate inhibits oncogene-induced mitogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 9057–9061 (1988).
10. Kubo, Y., Baldwin, T. J., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**, 127–133 (1993).
11. Ho, K. et al. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* **362**, 31–38 (1993).
12. Sui, J. L., Chan, K. W. & Logothetis, D. E. Na⁺ activation of the muscarinic K⁺ channel by a G-protein-independent mechanism. *J. Gen. Physiol.* **109**, 381–390 (1996).
13. Chan, K. W. et al. A recombinant inwardly rectifying potassium channel coupled to GTP-binding proteins. *J. Gen. Physiol.* **107**, 381–397 (1996).
14. Zhang, X., Jefferson, A. B., Auehavelkiat, V. & Majerus, P. W. The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 4853–4856 (1995).

15. Fukami, K., Endo, T., Imamura, M. & Takenawa, T. α-Actinin and vinculin are PIP₂-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 1518–1522 (1994).
16. Fan, Z. & Mikisich, J. C. Anionic phospholipids activate ATP-sensitive potassium channels. *J. Biol. Chem.* **272**, 5388–5395 (1997).
17. Schacht, J. Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of guinea-pig cerebral cortex *in vitro*. *J. Neurochem.* **27**, 1119–1124 (1976).
18. Kim, J., Mosior, M., Chung, L. A., Wu, H. & McLaughlin, S. Binding of peptides with basic residues to membrane containing acidic phospholipids. *Biophys. J.* **60**, 135–148 (1991).
19. Harlan, J. E., Yoon, H. S., Hajduk, P. J. & Fesik, S. W. Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* **34**, 9859–9864 (1995).
20. Reuveny, E. et al. Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein βγ subunits. *Nature* **370**, 143–146 (1994).
21. Huang, C.-L., Slesinger, P. A., Casey, P. J., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Evidence that direct binding of Gβ₂ to the GIRK1 protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* **15**, 1133–1143 (1995).
22. Huang, C.-L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. Binding of Gβ₂ to multiple regions of G protein-gated inward rectifier K⁺ channels. *FEBS Lett.* **405**, 291–298 (1997).
23. Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K. & Clapham, D. E. Gβ₂ binds directly to the G-protein-gated K⁺ channel. *I_{K(ACh)}*. *J. Biol. Chem.* **270**, 29059–29062 (1995).
24. Janney, P. A. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 169–191 (1994).
25. Peniston, J. T. Plasma membrane Ca²⁺-pumping ATPases. *Annu. NY Acad. Sci.* **402**, 291–303 (1982).
26. Pitscher, J. A., Toulhara, K., Payne, E. S. & Leffkowitz, R. J. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the β-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with Gβγ and lipid. *J. Biol. Chem.* **270**, 11707–11710 (1995).
27. Tagliatela, M., Wible, B. A., Caporaso, R. & Brown, A. M. Specification of the pore properties by the carboxyl terminus of inward rectifying K⁺ channels. *Science* **264**, 844–847 (1994).
28. Clapham, D. E. & Neer, E. J. New roles for G protein βγ-dimers in transmembrane signaling. *Nature* **365**, 403–406 (1993).
29. Casey, P. J., Graziano, M. P. & Gilman, A. G. G protein βγ subunits from bovine brain and retina: equivalent catalytic support of ADP-ribosylation of α subunit by pertussis toxin but differential interactions with Gα_i. *Biochemistry* **28**, 611–616 (1989).

Acknowledgements. We thank E. Phan for technical assistance; I. Bezprozvanny, C. Dessauer, D. Logothetis, C.-C. Lu, O. Moe, S. Muallem and H. Yin for discussions and advice; L. Jan for GIRK1 and ROMK1 antibodies; C. Dessauer and A. Gilman for Gα_q; P. Casey for Gβ₂; and R. Alpern for support and encouragement. This work was supported by grants from the NKF of Texas (C.L.H.) and from the AHA and NIH (D.W.H.).

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.L.H. (e-mail: chuan1@mednet.swmed.edu).

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire*, SiQun Xu*, Mary K. Montgomery*, Steven A. Kostas[†], Samuel E. Driver[‡] & Craig C. Mello[‡]

* Carnegie Institution of Washington, Department of Embryology, 115 West University Parkway, Baltimore, Maryland 21210, USA

† Biology Graduate Program, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA

‡ Program in Molecular Medicine, Department of Cell Biology, University of Massachusetts Cancer Center, Two Biotech State 213, 373 Plantation Street, Worcester, Massachusetts 01605, USA

Experimental introduction of RNA into cells can be used in certain biological systems to interfere with the function of an endogenous gene^{1,2}. Such effects have been proposed to result from a simple antisense mechanism that depends on hybridization between the injected RNA and endogenous messenger RNA transcripts. RNA interference has been used in the nematode *Caenorhabditis elegans* to manipulate gene expression^{3,4}. Here we investigate the requirements for structure and delivery of the interfering RNA. To our surprise, we found that double-stranded RNA was substantially more effective at producing interference than was either strand individually. After injection into adult animals, purified single strands had at most a modest effect, whereas double-stranded mixtures caused potent and specific interference. The effects of this interference were evident in both the injected animals and their progeny. Only a few molecules of injected double-stranded RNA were required per affected cell, arguing against stoichiometric interference with endogenous

Figura 4: Paper publicado por Fire et al. em 1998: Principal marco que inicia os estudos voltados ao RNA de interferência e o torna uma poderosa ferramenta na biologia molecular para o entendimento das funções gênicas. Este trabalho demonstrou os efeitos inesperados da injeção de moléculas dsRNA em *C.elegans*: os dsRNA induziam o silenciamento gênico de maneira específica na qual alguns animais ainda eram dotados de alterações no fenótipo.

Assim, o RNAi tornou-se uma ferramenta robusta, capaz de causar alterações na expressão gênica de linhagens estabelecidas ou primárias de determinados genes.

O processamento do RNAi é iniciado quando moléculas longas de RNA dupla fita (centenas de nucleotídeos) dsRNA (uma fita sense e outra fita antisense) são incorporadas pelas células. A fita sense é aquela que possui a região homóloga ao RNA mensageiro alvo enquanto a antisense é a sua complementar (Bernstein *et al.*, 2001). Por mecanismos evolutivos, toda vez que duplas fitas de RNA são incorporadas pelas células, ocorre a ativação e o reconhecimento de uma endonucleíase denominada de DICER, semelhante a RNA polimerase III, que então cliva esta longa fita em pequenos fragmentos de RNA identificados em pequenos duplexes de 21 a 25 nucleotídeos, com estrutura molecular bem definida, sendo um grupo fosfato na extremidade 5' e dois nucleotídeos "overhanging" na extremidade 3', conhecidos como siRNA (small interfering RNA) (Elbashir *et al.*, 2001). Estes siRNA são incorporados por um complexo denominado RISC (RNA-Induced Silencing Complex) o qual tem a função primordial de separar a dupla fita e utilizar a antisense como guia para localizar e degradar o RNA mensageiro alvo através de um mecanismo do tipo encontro controlado por difusão (diffusion-controlled encounter). Ainda, existem evidências que o acesso ao sítio é regulado por uma estrutura secundária do próprio RNA alvo, influenciando constantemente a eficiência da clivagem pela RISC. (Brown *et al.*, 2005 ; Dykxhoorn *et al.*, 2003, 2005; Dorsett *et al.*, 2004).

Antes da descoberta do RNAi em 1998, havia tecnologias utilizando ácidos nucleicos antisense visando a inibição específica. Porém, comparada com outras estratégias, tais como antisense, oligonucleotídeos de DNA e ribozimas, o RNAi é muito mais potente, pois em menores concentrações suas funções são superiores quando comparado as estratégias citadas acima (Aagaard & Rossi, 2007).

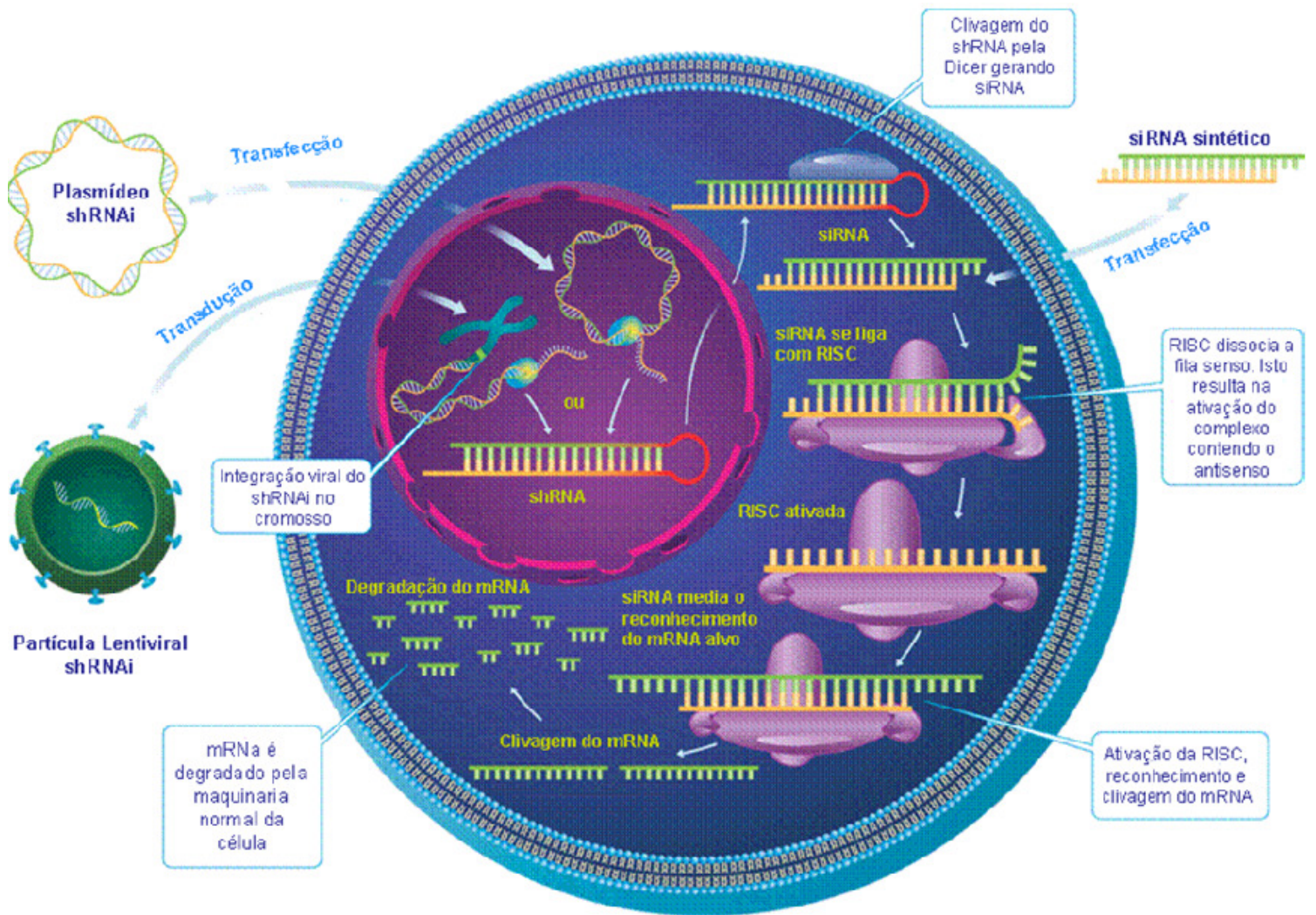


Figura 5: Indução do silenciamento gênico através do RNA de interferência. A figura demonstra as três formas de introduzir RNAs nas células; através da transfecção direta de siRNA sintéticos ou através da utilização de vetores plasmidiais e virais, os quais expressam shRNAi. Ao entrar na célula são reconhecidos por uma endorribonuclease – DICER e processados em siRNA de 21 a 25 nucleotídeos, os quais são reconhecidos por um complexo denominado RISC que utiliza e direciona a fita antisense para reconhecer e clivar o RNAm alvo. Uma vez clivado, esse RNA mensageiro será degradado pelas RNases citoplasmáticas (Sigma Aldrich).

Assim, o câncer se caracteriza como uma doença complexa que afeta diversas vias celulares, tais como o ciclo celular, sinalização intracelular alterada, reparo de DNA, apoptose, respostas a determinados tumores, influência do microambiente, invasão celular e

metástase. Hoje, contamos com uma gama de ferramentas que auxiliam e direcionam nossos estudos da evolução de diversos tumores, dentre as quais destacam-se: modificações pós traducionais e alterações na sinalização, sendo as mais intrinsecamente associadas à tumorigênese. Recentemente, diversas tecnologias nos permitem estabelecer diferenças entre células normais e células tumorais, e assim, contribuem para o conhecimento do processo de desenvolvimento de tumores. Estudos direcionados por Landmark têm sugerido que as maiores alterações a nível celular resultam de alterações epigenéticas, tais como ativação de determinados oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, receptores de citocinas e receptores de fator de crescimento (Navarro e Esteller, 2008). Assim, atualmente nossos estudos estão direcionados para a identificação de marcadores associados aos tumores, que em um primeiro momento possam atuar diretamente no diagnóstico e prognóstico, além do desenvolvimento de terapias eficazes para minimizar ou até mesmo erradicar a instalação e progressão de processos tumorais.

A Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX) visa e têm demonstrado alternativas relevantes e promissoras, para o desenvolvimento de terapias que garantem uma proteção significativa em modelos de melanoma murino como base para outros estudos em tumores humanos. No presente trabalho, utilizamos a metodologia de RNA de interferência para silenciarmos a proteína SOCS-1 em células de melanoma B16F10-Nex2 e assim, avaliar, compreender e caracterizar o envolvimento desta proteína no desenvolvimento e progressão tumoral.

Objetivos

Geral

O presente trabalho visa avaliar e caracterizar os efeitos do silenciamento de SOCS-1 em células de melanoma murino (B16F10-Nex2) em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Específicos

4.2.1. Obtenção das linhagens celulares de melanoma (B16F10-Nex2) transfectadas e selecionadas com os lentivírus contendo o plasmídeo vazio B16pLKO e contendo a construção shRNAi SOCS-1 B16 Δ SOCS-1;

4.2.2. Silenciar o gene que codifica a proteína SOCS-1 através de shRNAi (RNA de interferência) e acompanhar esse silenciamento por RT-PCR (PCR em Tempo Real); e Western blotting;

4.2.3. Avaliação *in vitro*, para caracterização das células em ensaios de migração celular, ensaios de invasão celular (MATRIGEL), ensaio clonogênico, ensaios de proliferação celular, análise morfológica (DAPI e faloidina), ciclo celular (PI) e análise da expressão de determinados receptores extracelulares e intracelulares resultante do silenciamento de SOCS-1 por citometria de fluxo (FACS);

4.3.4. Avaliação *in vivo*, da tumorigenicidade de células de melanoma das três linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1 em camundongos C57/b6, através do modelo subcutâneo e metastático;

Materiais e Métodos

Animais

Camundongos C57B/6 machos, com seis a oito semanas, foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos em isoladores com água, ração e serragem autoclavadas, em biotério a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de $55 \pm 10\%$ controladas. Todos os nossos protocolos experimentais seguiram as normas do Comitê de Ética e Pesquisa para Experimentação Animal da UNIFESP.

Linhagens celulares

A linhagem tumoral murina foi isolada de um melanoma espontâneo em animais C57B/6. Fidler (1975) obteve linhagens gradativamente mais agressivas e invasivas após sucessivas passagens *in vivo*, numerando-as de F1 a F10. A linhagem mais agressiva é a B16F10, fornecida pelo Instituto Ludwig de Pesquisas contra o Câncer. Na Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX) foram selecionadas sublinhagens destas, sendo nomeadas de Nex 1 a 6, com diferentes propriedades fenotípicas e apresentando graus distintos de agressividade ou virulência. A sub-linhagem B16F10-Nex- 2 é a mais próxima da linhagem original, apresentando baixa imunogenicidade e moderada virulência, desenvolvendo tumores subcutâneos que não metastizam para os pulmões, mas capaz de formar numerosos nódulos pulmonares quando inoculados pela via endovenosa.

A linhagem de melanoma murino B16F10-Nex2 foi cultivada em meio RPMI-1640 suplementado com 10 mM de HEPES, 24 mM de bicarbonato de sódio, 40 mg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB), pH 7,4. Para repique das células, foram utilizados PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), para lavagem, e PBS/EDTA (PBS com 0,02% de EDTA), para liberação das células dos frascos de cultura.

A linhagem celular B16F10-Nex2 que não passou pelo processo de transfecção foi denominada de B16 wild type, enquanto as linhagens criadas a partir da transfecção com: o plasmídeo vazio foi denominada de B16 pLKO e com a construção para o silenciamento de SOCS-1 foi denominada de B16 Δ SOCS-1.

Produção de partículas lentivirais contendo construção para expressão de shRNAi para SOCS-1 e seqüenciamento.

A fim de silenciar a expressão de SOCS-1 em células de melanoma (B16F10 nex2), foi construído um oligonucleotídeo denominado de shRNAi SOCS-1, além da utilização controle do plasmídeo vazio denominado de pLKO1 PURO. A construção sense e antisense é representado abaixo:

shRNAi SOCS-1 Sense/Antisense

5'CCGGCTACCTGAGTTCCTTCCCCTTCTCGAGAAGGGGAAGGAACTCAGGTAG
TTTTTG 3'

5'AATTCAAAAACTACCTGAGTTCCTTCCCCTTCTCGAGAAGGGGAAGGAACTC
AGGTAG 3'

Este oligonucleotídeo foi clonado no plasmídeo pLKO.1PURO (Zufferi *et al.*, 1997), sendo a base de nossa construção para shRNAi SOCS-1. O plasmídeo vazio também foi utilizado como controle. Para a síntese das partículas virais foi necessária a transfecção em células HEK-293 (células humanas de rim) através de um mix de plasmídeos, cada qual dando origem a uma particularidade estrutural das partículas virais. Assim, 1 μ g de pLKO PURO total contendo a construção SOCS-1, 750 ng de psPAX (plasmídeo responsável pelo empacotamento), 250 ng de pMD2G (plasmídeo responsável pelo envelope viral) e 7x10⁵ de HEK-293 em uma placa de 12 poços, tendo uma confluência de 60 á 80% . Os plasmídeos para uso em nossos experimentos foram adquiridos da Addgene®. Para expansão plasmidial, bactérias *E.coli* DH5 α foram transformadas por choque térmico com

os vetores produzidos, os quais foram purificados pelo método de mini-preparação ou maxi-preparação alcalina (mini e maxiprep). A construção do shRNAi proposta foi seqüenciada no plasmídeo pLKO.1 PURO, e o seqüenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano através de 350 ng/μL de amostra (plasmídeo + inserto) utilizando o MegaBACE1000 (GE Healthcare). As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090. As seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o 'Base Caller Cimarron 3.12.'

Transfecção de células de melanoma B16F10-Nex2 com os vetores virais e obtenção dos clones B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

As células de melanoma murino B16F10 nex2 foram transfectadas utilizando as seguintes construções: partículas virais contendo o plasmídeo vazio (pLKO1) e partículas virais contendo a construção shRNAi SOCS-1, que tem como alvo a proteína SOCS-1. Neste ensaio, as células B16F10 nex2 foram cultivadas em placas de 24 poços até atingir a confluência de 80%. Posteriormente, o meio foi aspirado completamente e adicionado aos poços 100 μL do sobrenadante obtido da cultura das células empacotadas (produto da produção lentiviral das HEK-293) diluídos na razão 1:1 com o meio completo contendo 10 μg/mL de FUGENE® para um volume final de 200 μL, e assim, uma carga viral suficiente para a transfecção (MOI-Multiplicity of Infection) foi introduzida nessas células de melanoma (B16F10 nex2). No período de 12 a 16 horas as partículas virais ficaram em contato com as células B16F10-Nex2 em estufa a 37°C e após esse período, as células foram lavadas. O processo de seleção das células transfectadas e contendo os insertos foi baseado no tratamento das células com um antibiótico que o plasmídeo carrega, o gene de resistência-Puromicina. Uma curva de puromicina foi realizada em células normais (sem transfecção) e a concentração de 5 μg/mL foi a concentração ideal, capaz de destruir todas as células sem a expressão dos plasmídeos. Assim, essa concentração foi a chave para o processo de seleção contendo a nossa construção. Portanto, as células que se apresentaram viáveis à concentração de 5μg/mL durante 5 dias com puromicina foram caracterizadas como as células que contém os plasmídeos efetores, e assim, foi dado a continuidade e a

realização deste trabalho. Um segundo tratamento com puromicina foi realizado, a fim de estarmos certos de que as células realmente expressavam os plasmídeos e conseqüentemente a nossa construção.

A Figura 6 representa o mapa do vetor viral baseado em lentivírus para a expressão do shRNAi.

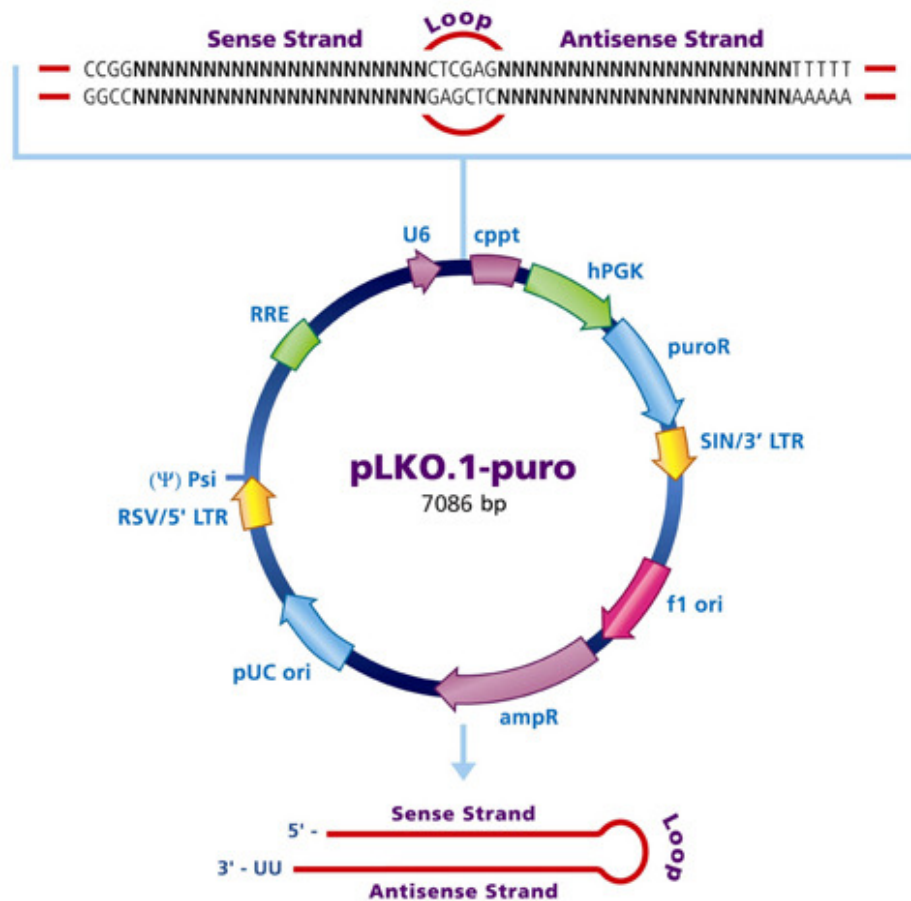


Figura 6: A construção foi desenhada para a expressão de shRNAi, cuja seqüência foi complementar ao mRNA do gene SOCS-1, o que nos possibilitou ativar os diversos mecanismos intrinsicamente relacionados aos mecanismos de ativação do processo de silenciamento gênico. O shRNAi representado acima contém regiões sense e antisense separados pelo loop (alça). O vetor viral pLKO1 PURO possui o gene de resistência á puromicina, controlado pelo promotor PGK para a seleção dos clones celulares. Esta construção também possui gene de resistência para a ampicilina (AMP) e a origem de replicação (pUC Ori), evento que nos possibilitou a expansão plasmidial em bactérias DH5 α . Os cassetes de expressão da puromicina (PURO) e do

shRNAi são flanqueados pelas regiões terminais repetidas (LTR) do HIV, o que permite a total integração no genoma da célula. Essa particularidade tornou o efeito do silenciamento uma forma constitutiva e não transitante em nossas células contendo a construção shRNAi SOCS-1. A região 3'LTR possui uma modificação, evento que impede sua auto inativação após a integração (SIN), ou seja, impede a replicação viral na célula. A construção também possui um sinal de empacotamento de RNA, elemento de transporte constitutivo (trato central de polipurina) (cppt) e elemento de resposta reversa (RRE) que aumentam a eficácia da transfecção.

Ensaio de formação de colônias das linhagens B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

Neste ensaio, as células selecionadas previamente com puromicina foram transferidas para garrafas de 25 cm² em um número de (50-100 células) para cultivo de 4 a 5 semanas. Após este período, as colônias com mais de 20 células foram submetidas a contagem em um microscópio óptico com aumento de 100 X e 200 X

Extração RNAm das linhagens de B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1 e síntese de cDNA pelo método da Transcriptase Reversa (RT)

A extração do mRNA das células de melanoma controle e silenciadas pelo shRNAi foi realizada através da metodologia do TRIZOL (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita com 1μg de RNA total para utilização da transcriptase reversa. A reação foi realizada no volume final de 20μL na presença dos seguintes reagentes: 1μL de dNTPs mix 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 4μL de tampão de reação 5X (Tris-HCL 50mM, KCL 75mM e MgCl₂ 3mM), 2μL de DTT 100mM, 1μL de inibidor de RNase (RNase OUT, Invitrogen), 40U/μL, 1μL do primer OLIGO dT 0,5μg/μL, 1μL da enzima transcriptase reversa SuperScript II (GibcoBRL). As etapas da reação de transcrição foram às seguintes: 1- Desnaturação 65°C por 5 minutos; 2- Síntese a 42°C por 60 minutos; 3- Reação de inativação da transcriptase reversa 70°C por 15 minutos. Posteriormente, as amostras serão dosadas por espectrofotometria (razão

260/280) e tratadas com DNaseI (Quiagen) durante 15 minutos a 37°C, afim de evitar contaminação de DNA para assim realizarmos posteriormente a amplificação deste cDNA.

Análise da expressão gênica de SOCS-1 em Tempo Real (RT-PCR) nos transcritos de B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

Para a análise quantitativa de nossos transcritos o cDNA foi submetido ao Real Time por uma técnica de PCE multiplex denominada de “Taqman Technology”, padronizada pela Applied Biosystem através do equipamento ABI Prism 7700. Nesse ensaio, a primeira fita do cDNA foi amplificada em 25 µL de reação contendo 12,5 µL de Taqman, 2X mistura de “master mix”, primers específicos para o gene desejado (900 nM cada) e probes (200 nM). A etapa de amplificação foi a seguinte: 1- desnaturação a 95°C durante 10 minutos, a qual ativa a enzima AmpliTaq Gold; 2- 40 ciclos a 95°C 15 segundos (desnaturação) e 60°C durante 1 minuto (anelamento). Em seguida, a fluorescência foi lida no detector ABI Prism 7700 Sequence Detector. Através dos valores da fluorescência obtivemos o Ct (threshold cycle), isto é, o ciclo no qual a quantidade de produto formado corresponde a concentração inicial das fitas moldes (RNAm/cDNA) amplificados pela reação. Os valores de Ct de cada amostra foram normalizados através do método da curva padrão, utilizando os resultados da expressão do gene HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase), uma enzima essencial para a sobrevivência das células por estar relacionada aos processos inerentes ao metabolismo celular, e por isso, sua expressão é constitutiva. Para a construção da curva, realizou-se a diluição 1X 1/3, 1/27 e 1/81 das amostras positivas de cDNA do gene de interesse.

Os primers usados no ensaio de amplificação para o gene da proteína SOCS-1 foram sintetizados pela Prodimol (IdT) e as seqüências são as seguintes:

SOCS-1 forward

5'CCCTCGAGTAGGATGGTAGC3'

SOCS-1 reverse

5'ACGAAGACGAGGACGAGGAG 3'

HPRT forward

5'-AAGGACCTCTCGAAGTGTGGATA 3'

HPRT reverse

5'-CATTTAAAAGGAACTGTTGACAACG 3'

Detecção da proteína SOCS-1 através de Western Blotting nas linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

Para avaliar o silenciamento da expressão de SOCS-1, Western blotting foi realizado, iniciando-se pelo método de extração protéica em conjunto com a extração de RNA pelo método de TRIZOL, na qual foi adicionado o passo de lavagem com guanidina em etanol 95% e SDS 1%, sendo que as proteínas são posteriormente precipitadas com isopropanol overnight. A massa protéica (30 μ g) foi fervida com tampão contendo agente redutor β -mercaptoetanol e posteriormente separada em gel de 10% SDS-PAGE. Em seguida, utilizou-se a transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose 0,2 μ m (Amersham Bioscience). O bloqueio com leite Mólico 5% e as etapas de lavagem foram realizadas, e as membranas incubadas com 3 μ g/mL de anticorpos monoclonais anti-SOCS-1 mouse (Invitrogen). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti estreptavidina-peroxidase (Sigma Aldrich) e reveladas com DAB (Sigma Aldrich).

Ensaio de migração celular nas linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

As linhagens foram distribuídas em placas de cultura de 6 poços, na concentração de 5x10⁵/poço e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO². Posteriormente, foram retiradas da estufa, trocado o meio de cultura, lavadas com solução PBS 1X e com o auxílio de uma ponteira de 1000 μ L, um “risco” no meio da placa foi realizado. Imagens desse momento (momento 0) foram capturadas em triplicata e comparadas com imagens realizadas 24 horas após. O diâmetro do encontro das células do tempo zero (0 horas) e após vinte e quatro (24 horas) foram aferidos, em dez diferentes pontos, e transformados em porcentagem de migração.

Ensaio de invasão celular utilizando transwell – MATRIGEL com as linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

Células (5×10^3) de cada linhagem foram adicionadas em transwell (MATRIGEL) e SFB na base da placa. As células que ultrapassaram a membrana do transwell em direção ao SFB foram consideradas células que tiveram a capacidade de invadir a matriz. As células que invadiram a matriz foram coradas por GIEMSA e contadas em microscópio óptico 100X em cinco diferentes campos, os quais foram realizados em triplicata.

Ensaio clonogênico das linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

A capacidade de determinadas populações de células tumorais de crescer em substrato sólido e assim formarem clones (colônias), indica o seu potencial tumorigênico. A fim de avaliar se o efeito do silenciamento de SOCS-1 em células B16F10-Nex2 afetou esse potencial, 5×10^3 células de cada linhagem foram plaqueadas em meio de agarose 1%, diluído em RPMI e acrescido de 20% de SFB. Trinta dias após esse plaqueamento avaliamos o efeito do silenciamento e comparamos com células B16 wild type quanto a formação de colônias, através da contagem desses clones em microscópio óptico.

Ensaio de proliferação celular das linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

A fim de avaliar se o efeito do silenciamento afeta diretamente o crescimento das células tumorais, 5×10^4 células de cada linhagem foram plaqueadas em diferentes placas de Petri, por 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, ressuspendidas e contadas (20 μ L) em câmara de Neubauer. A contagem foi realizada em triplicata e o azul de Trypan foi usado para detectar as células viáveis.

Análise morfológica das linhagens B16F10 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1, utilizando DAPI e FALOIDINA.

Para este experimento, 2×10^4 células das três linhagens foram plaqueadas em lamínulas redondas esterilizadas (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA) e inseridas em placas de 24 poços contendo meio RPMI e suplementado com 10% de SFB até atingir a confluência de 80%. Após o tempo de incubação as lamínulas foram lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído gelado 2% (Sigma) durante 30 minutos. As lamínulas foram novamente lavadas e permeabilizadas com PBS 0.1% Triton durante 40 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS 1X e incubadas com Faloidina-TRICT na concentração 1:1000 (Invitrogen) e 1mg/mL de DAPI (Invitrogen) diluído em PBS por 1 hora. As lamínulas foram posteriormente retiradas e ancoradas em lâminas na presença de 4μL de vectashield (Sigma) e a morfologia celular evidenciando o citoplasma e a área nuclear foi observada em microscópio de fluorescência na objetiva de 60X com óleo de imersão. DAPI (azul) foi observado no comprimento de onda de excitação 350 nm e 470 nm e FITC (vermelho) observados em comprimento de onda de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm. Para faloidina-TRICT (actina vermelha) foi usado um filtro de excitação de comprimento de onda 580 nm e emissão 620 nm. A área nuclear das células foi calculada utilizando o diâmetro das células e a fórmula: $S = \pi \cdot d/2 \cdot D/2$, d=diâmetro menor; D=diâmetro maior.

Avaliação do ciclo celular nas linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1 através da citometria de fluxo (FACS).

As linhagens celulares B16 pLKO, B16 wild type e B16 ΔSOCS-1 (10^6) em suspensão foram fixadas e tratadas com 2 % PBS e submetidas a centrifugação por 15 minutos a 4°C. As células foram lavadas três vezes com PBS e ressuspensas com 1mL de etanol gelado por 1 hora. Após a lavagem com PBS as células foram ressuspensas em solução DNA staining (2.5 μg/mL iodeto de propídio (PI) e 0.5 mg/mL RNase A em PBS) e detectadas por citometria de fluxo para avaliação do ciclo celular (FACScan flow

cytometer - BD Biosciences). Os dados foram analisados pelo software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Avaliação da expressão de determinando receptores intracelulares e extracelulares nas linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1 por citometria de fluxo (FACS).

As linhagens B16 pLKO, B16 wild type e B16 Δ SOCS-1 (10^6) em suspensão foram fixadas e tratadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído, 0,5% de saponina, 1% BSA e 1% soro de camundongo por 20 minutos a 4° C. Células foram lavadas em solução A (PBS containing 0,5% saponina, 1% BSA e 1% soro de camundongo) e incubadas na mesma solução com os anticorpos específicos para captura de: Porção α do receptor de insulina, porção β do receptor de insulina, EGFR, p-EGFR, FGFR-3, FGFR-4 and FGFR-5 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) por 1 hora a 4°C e lavados novamente e incubados com um α -Ig de coelho conjugado com fluorocromo (phycoerythrin) por 1 hora a 4°C. As células foram lavadas mais duas vezes com a solução A e fixadas com 0,4% de paraformaldeído. A fluorescência foi mensurada através do FACScan flow cytometer (BD Biosciences), e os dados foram analisados pelo software FlowJo (TriStar).

Ensaio *in vivo*

Modelo subcutâneo

A fim de induzir formação de um tumor, e comparar o papel *in vivo* do silenciamento de SOCS-1 em células tumorais, os camundongos machos C57B/6 foram desafiados pela via subcutânea contendo 5×10^4 células de cada linhagem. Quinze dias após o desafio, os camundongos foram acompanhados em dias alternados e seus respectivos volumes tumorais foram aferidos. O volume tumoral máximo permitido foi de 3.000 mm³. O número de camundongos utilizados para este experimento foi de 18 animais no total,

sendo 6 animais para cada uma das 3 diferentes linhagens, B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1.

Curva de sobrevida

A curva de sobrevida foi utilizada para determinar o potencial de um determinado agente em promover a morte e/ou proliferação celular. Os camundongos acima foram desafiados com as 3 linhagens celulares e também serviram como parte de um controle de curva de sobrevida.

Modelo Metastático (Modelo endovenoso)

Para avaliar se o silenciamento de SOCS-1 em células de melanoma murino afeta a capacidade de colonização pulmonar, o modelo utilizado seguiu os seguintes passos: Inicialmente as células foram plaqueadas em garrafas de cultura 75 cm², cultivadas em meio RPMI e condicionadas em estufa a 37°C e 5% de CO² até atingirem a confluência máxima. A fim de retirar todo o conteúdo de soro fetal bovino (SFB) e evitar uma possível resposta inespecífica, as células foram lavadas três vezes com solução salina (PBS 1X) e repicadas utilizando PBS/EDTA e ressuspensas em meio RPMI na ausência de SFB. 5x10⁵ Células de todas as linhagens foram injetadas endovenosamente na base da cauda dos camundongos de seis a oito semanas. Quinze dias após esse desafio, os camundongos foram sacrificados para que a contagem de nódulos pulmonares fosse realizada e a pesagem dos mesmos. O número de camundongos utilizados para este experimento foi de 18 animais no total, sendo 6 animais de 3 diferentes grupos, B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

Análises estatísticas

Os dados aqui apresentados como média +/- erro padrão, foram comparados entre si pelo teste T ou por análise de variância (ANOVA) e quando conveniente, utilizamos o software InStat versão 3.05 (GraphPad, San Diego, CA).

As análises do Real Time PCR foram submetidas à análise pelo REST e ambos os dados foram considerados com significância estatística quando $p < 0.05$.

Resultados

Análise da expressão gênica de SOCS-1 em Tempo Real (RT-PCR) nos transcritos de B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

O primeiro parâmetro molecular a ser avaliado quando silenciarmos um alvo gênico é evidenciar o efeito de seu silenciamento via expressão do “fator mensagem”, ou seja, a relação da expressão de mRNA total com o mRNA alvo em amostras de RNA. Com o intuito de estabelecer padrões de expressão relativa e correlação com o seu possível potencial de malignidade dos transcritos de SOCS-1, quantificamos a expressão dos transcritos em nossas linhagens.

A expressão dos transcritos de SOCS-1 nas linhagens B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1 tomaram como base a expressão relativa (1) com o controle B16F10-Nex2, e assim essa comparação nos rendeu o nível de silenciamento gênico comparado ao controle. O nível de expressão dos transcritos foi normalizado com a expressão do controle endógeno do HPRT (hypoxantine guanine phosphoribosyltransferase), um gene que codifica uma enzima essencial no metabolismo celular das purinas, e assim, é expresso constitutivamente.

Como controle para a expressão do silenciamento específico, utilizamos a construção de um lentivírus contendo o plasmídeo vazio, ou seja, ausência da construção (B16 pLKO). A figura 1 revela a expressão dos transcritos de SOCS-1 nas linhagens B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1. Assim, como podemos evidenciar a linhagem que foi transfectada com a construção contendo o plasmídeo vazio e originando a linhagem B16 pLKO (barra branca) não sofreu nenhum tipo de alteração na expressão do transcrito de SOCS-1, quando comparado e normalizado com a linhagem controle B16 wild type (barra preta). Já a construção que visava o silenciamento permanente e específico dos transcritos de SOCS-1 (shRNAi SOCS-1) foi transfectada e a linhagem B16 Δ SOCS-1 foi criada. Como podemos evidenciar, houve o silenciamento de 83% quando comparado e normalizado com o controle B16.

Real Time PCR

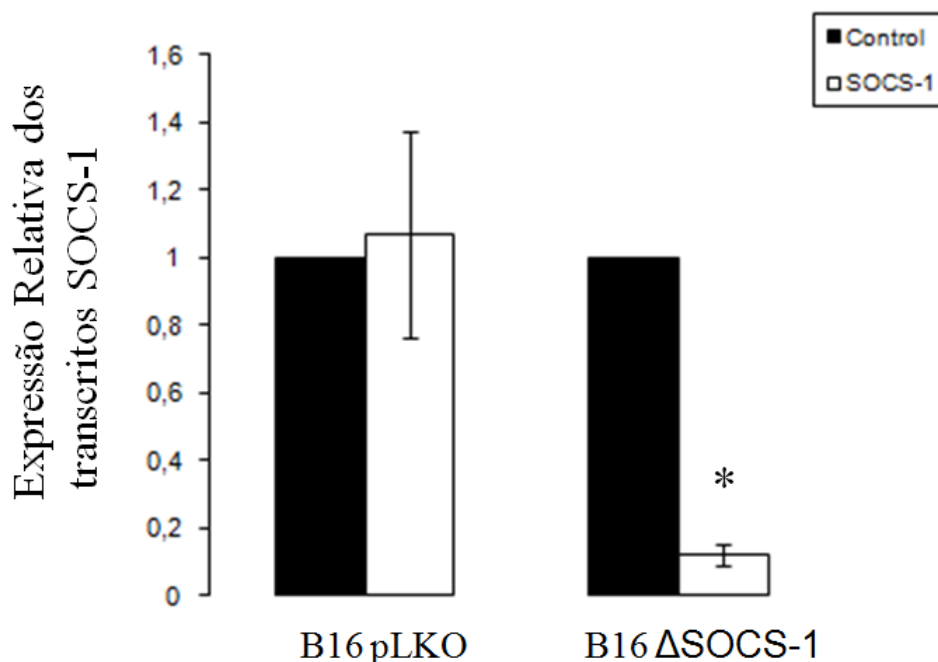


Figura 7: Análise da expressão relativa dos transcritos de SOCS-1 em linhagens B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1. Expressão dos transcritos do gene SOCS-1 nas linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1 por RT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido através da reação de transcrição reversa do mRNA total de amostras extraídas pelo método TRIZOL® e amplificado por primers específicos. A leitura da reação foi realizada através do equipamento ABI PRISM 7700. Os resultados da expressão dos transcritos de SOCS-1 foram normalizados em relação à expressão do controle endógeno do gene HPRT. O resultado foi expresso como média dos valores obtidos em três experimentos independentes e o valor de $p < 0.05$. Barras brancas representam as linhagens que sofreram a transfecção do sistema de shRNAi, representado pelo pLKO e B16 ΔSOCS-1 respectivamente. Barras pretas representam a expressão do controle B16 wild type assumindo o valor (1 ou 100%) como total, e a partir dessa expressão, foram normalizados com a expressão de HPRT e o efeito do silenciamento foi indicado. A linhagem transfectada com a construção do plasmídeo vazio (B16 pLKO) não sofreu nenhum tipo de silenciamento aleatório, a linhagem que foi transfectada com o shRNAi específico para o silenciamento de SOCS-1 (B16 Δ SOCS-1) foi específico, e a razão de silenciamento foi de 83%

A redução significativa da expressão dos transcritos de SOCS-1 permitiu a avaliação do papel dessa proteína na fisiologia das células e seu potencial envolvimento na malignidade.

Detecção da proteína SOCS-1 através de Western Blotting nas linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

Para darmos continuidade à caracterização celular e envolvimento da SOCS-1 no processo tumorigênico em nossas linhagens, o próximo passo foi a constatação de que a proteína, ou seja, o produto final, estaria realmente silenciado, em paralelo ao silenciamento de 83% da expressão dos transcritos de SOCS-1. Assim, 30 μ g de proteína total foram analisadas em Western Blotting. Para normalizar a concentração de proteínas, todas as amostras protéicas das linhagens celulares foram purificadas e ensaiadas por Bradford, bem como dosadas em espectrofotômetro e a concentração foi calculada a partir do controle de albumina utilizado na reação.

A proteína SOCS-1 foi detectada com um peso molecular de 25 kDa. A formação de dímeros e outros complexos que possivelmente poderiam estar envolvidos com a SOCS-1 foram descartados, pois na reação utilizamos um tampão com agentes desnaturantes e redutores como β -mercaptoetanol, SDS, DTT, além da fervura das amostras por cinco minutos. Como é mostrado na Figura 8, a concentração de SOCS-1 foi menor após silenciamento, em comparação com as demais linhagens, condizente com os dados obtidos no Real Time PCR. Nas linhagens B16 wild type e B16 pLKO, não houve alteração dos níveis de expressão.



Figura 8: Detecção da proteína SOCS-1 nas linhagens celulares. Proteína total (30 μ g) foi fervida em tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol e posteriormente corrida em gel de 10% SDS-PAGE. As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose 0,2 μ m (Amersham Bioscience). O bloqueio e as etapas de lavagem foram feitas conforme Material e Métodos e as membranas incubadas com 3 μ g/mL de anticorpos monoclonais anti-mSOCS-1 (Invitrogen). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti estreptavidina-peroxidase (3 μ g/mL)

Os dados do silenciamento da expressão dos transcritos mRNA para SOCS-1 concordaram então com menor expressão protéica de SOCS-1 nas células B16 Δ SOCS-1

Ensaio de proliferação celular das linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

A fim de avaliar o efeito do silenciamento e o envolvimento da proteína SOCS-1 no crescimento tumoral, 5 $\times 10^4$ células de cada linhagem foram plaqueadas em placas de Petri, ressuspendidas e contadas em triplicata em diferentes períodos de tempo. A figura 9 traz o número de células viáveis ($\times 10^4$), representadas no ensaio de curva de crescimento. Como podemos evidenciar, as três linhagens celulares em questão se comportam em equilíbrio até o período de 48 horas, indicando que até esse momento as células apresentam a mesma cinética de crescimento celular, aproveitando todos os recursos intracelulares de replicação. A linhagem celular B16 Δ SOCS-1 não foi capaz, no entanto, de acompanhar a cinética de crescimento das demais linhagens no período posterior a 48 horas. As linhagens B16 pLKO e B16 wild type continuaram na mesma cinética de crescimento até o período de 120 horas. Essa observação colocou a linhagem B16 Δ SOCS-1 em cheque, sendo uma forte evidência do envolvimento de SOCS-1 em alguma via de sinalização que regula o crescimento exponencial de células.

Cinética de crescimento celular

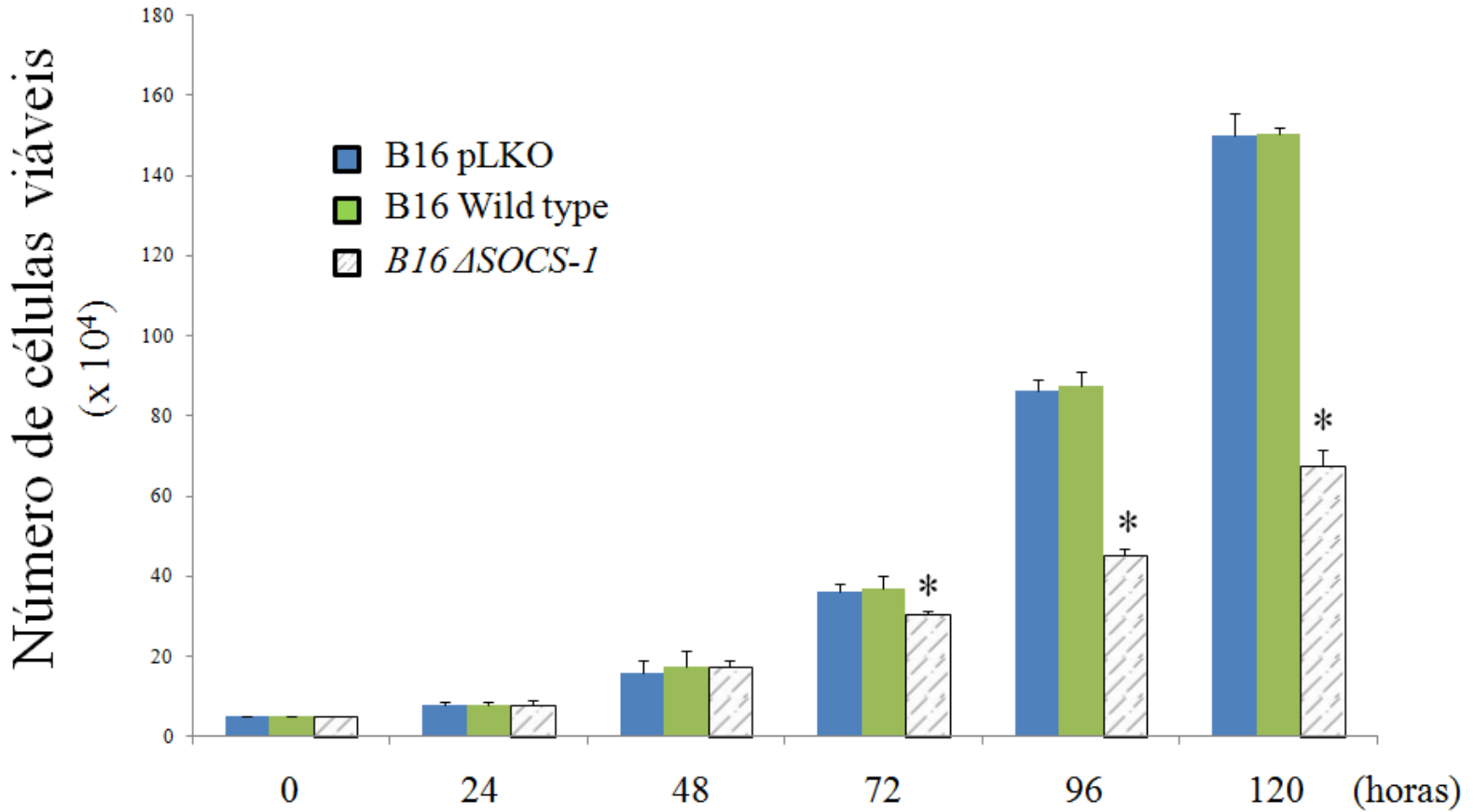


Figura 9: Ensaio de crescimento celular das linhagens. 5×10^4 Células de cada linhagem foram plaqueadas durante o período indicado, foram ressuspendidas, e $20 \mu\text{L}$ dessa suspensão foi usado para contagem em câmara de Neubauer. A contagem foi realizada em triplicata e o azul de Trypan foi usado para detectar as células viáveis. * $p < 0.05$.

Ensaio de migração celular nas linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

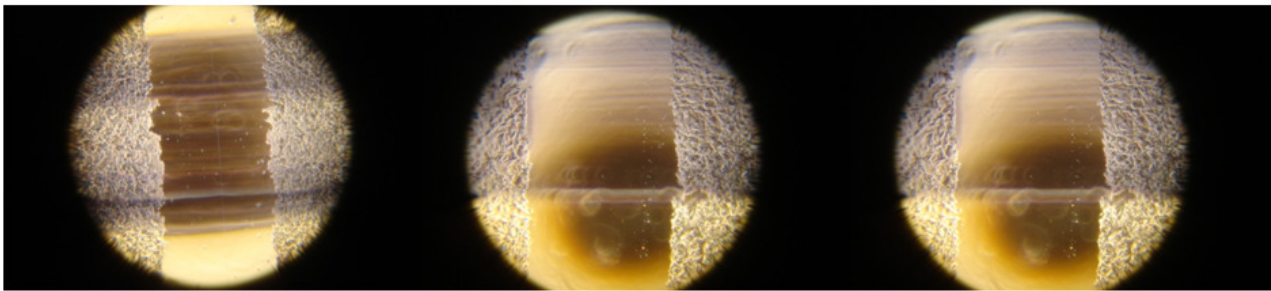
A fim de avaliarmos a funcionalidade da proteína SOCS-1 e como ela poderia estar envolvida nos diversos mecanismos inerentes à migração celular, 5×10^5 células de cada linhagem foram plaqueadas em placas de 6 poços e incubadas 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO_2 até atingirem 80% de confluência. Foi utilizada a técnica “monolayer wound healing assay”, que consiste de, com o auxílio de uma ponteira de 1000 μL , interromper com um “risco” vertical a monocamada de células previamente plaqueadas. As células na borda desse risco são observadas em 8 locais diferentes por 24 h e medido o preenchimento do espaço vazio pela migração gradativa das células. A Figura 10a mostra a imagem microscópica do ensaio de migração celular nos tempos 0 horas e 24 horas, e a Figura 10b representa graficamente a porcentagem da migração das linhagens celulares. Em ambas as figuras podemos evidenciar o tempo de migração celular alterado na linhagem B16 Δ SOCS-1. No tempo 0 horas, todas as células mantêm uma distância consideravelmente padrão, o que não acontece após 24 horas, conforme a cinética de migração celular das linhagens celulares. As migrações das linhagens B16 pLKO de 63%, e B16 wild type de 75%, não apresentaram diferenças significativas. Porém, quando a proteína SOCS-1 foi silenciada, a linhagem celular apresentou 23% de migração celular. Esse resultado parece relacionar a SOCS-1 também a eventos que envolvem o citoesqueleto das células e mecanismos de aderência e não aderência que permitem a migração celular.

Tempo 0 horas

B16 Wild type

B16 pLKO

B16 Δ SOCS-1



Tempo 24 horas

B16 Wild type

B16 pLKO

B16 Δ SOCS-1

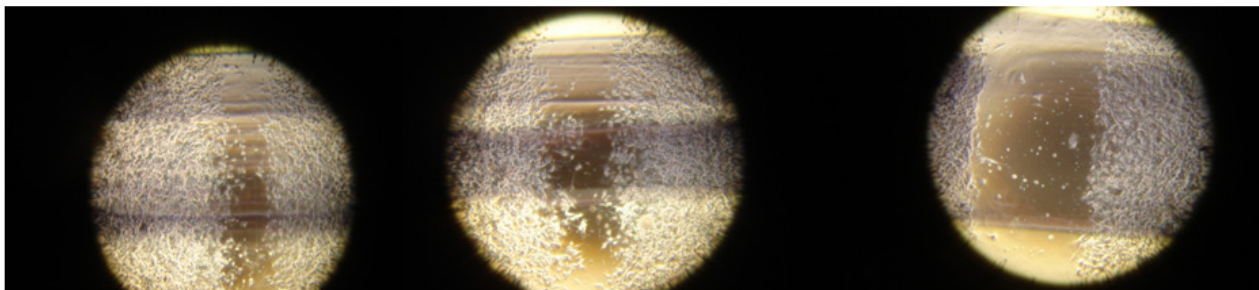


Figura 10a: Ensaio de migração (“Monolayer wound healing assay”) celular. 5×10^5 Células de cada linhagem/poço foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . A monolayer foi lavada com PBS 1X e riscada com uma ponteira de $1000 \mu\text{L}$. Imagens do momento 0 e 24 horas após, foram comparadas e aferidas, em 8 diferentes pontos, e transformados em porcentagem média de migração. A taxa de migração das células B16 Δ SOCS-1 foi claramente menor do que as demais linhagens celulares. Dados estatísticos da triplicata revelaram $p < 0.05$.

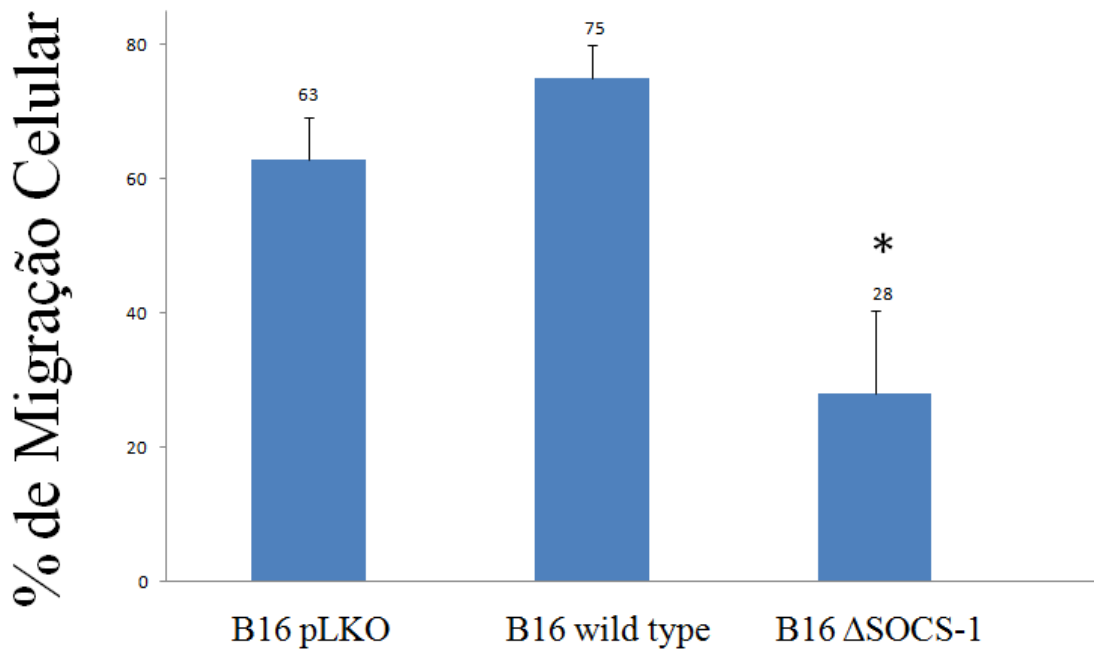


Figura 10b: Porcentagem média da migração celular (“Monolayer wound healing assay”): Dados quantitativos da migração mostrada na Fig. 9a..

Ensaio de invasão celular utilizando transwell – MATRIGEL com as linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

Ensaio de invasão são geralmente realizados a fim de evidenciar a capacidade de determinados tumores de invadir a matriz extracelular representada por Matrigel em sistema de transwell. As células tumorais devem atravessar a membrana para invadir o estroma e estabelecer metástases à distância. Elas fazem isso através da produção de proteases que degradam a matriz. Dos vários modelos *in vitro*, a utilização do Matrigel é a mais reprodutível. Em nosso trabalho, as células tumorais foram colocadas na porção superior, a qual é separada da porção inferior por uma membrana porosa (transwell) revestida com Matrigel. Na parte inferior do transwell utilizamos um quimioatratante, que em nosso caso foi o soro fetal bovino a fim de estimular a migração. Após um intervalo, as células tumorais foram recuperadas, coradas e contadas com a superfície inferior da membrana, tendo em mãos o perfil de células que foram capazes de invasão.

Assim, 5×10^3 células de cada linhagem foram plaqueadas em placas contendo transwell Matrigel e SFB na base da placa e deixadas a 37°C com 5% de CO_2 durante 24 horas. As células que ultrapassaram o transwell em direção ao SFB são consideradas células que tiveram a capacidade de invadir a matriz. A membrana ao final do experimento foi corado por GIEMSA e as células contadas em microscópio óptico 100X em cinco diferentes campos, em triplicata. A figura 11 representa a porcentagem de células que invadiram a matriz. Como podemos observar, as linhagens B16 pLKO e B16 wild type possuem um alto potencial de invasão e assim conseguiram invadir a matriz com eficiência de 89.58% e 91.8% respectivamente. Já a linhagem silenciada para o gene da SOCS-1 invadiu a matriz com densidade de 39.5%, e assim não foi capaz de apresentar o mesmo potencial invasivo das linhagens acima, evidenciando que a proteína SOCS-1 está envolvida nos mecanismos que permitem a invasão celular. Essa observação pode ser um passo importante para o desenvolvimento de uma terapia pontual, na qual a SOCS-1 se torna um alvo específico, pois uma vez silenciada, mesmo utilizando recursos de fatores de crescimento como Matrigel, as células não foram capazes de invadir os tecidos, diminuindo os riscos de metástases.

Ensaio de Invasão – Matrigel (transwell)

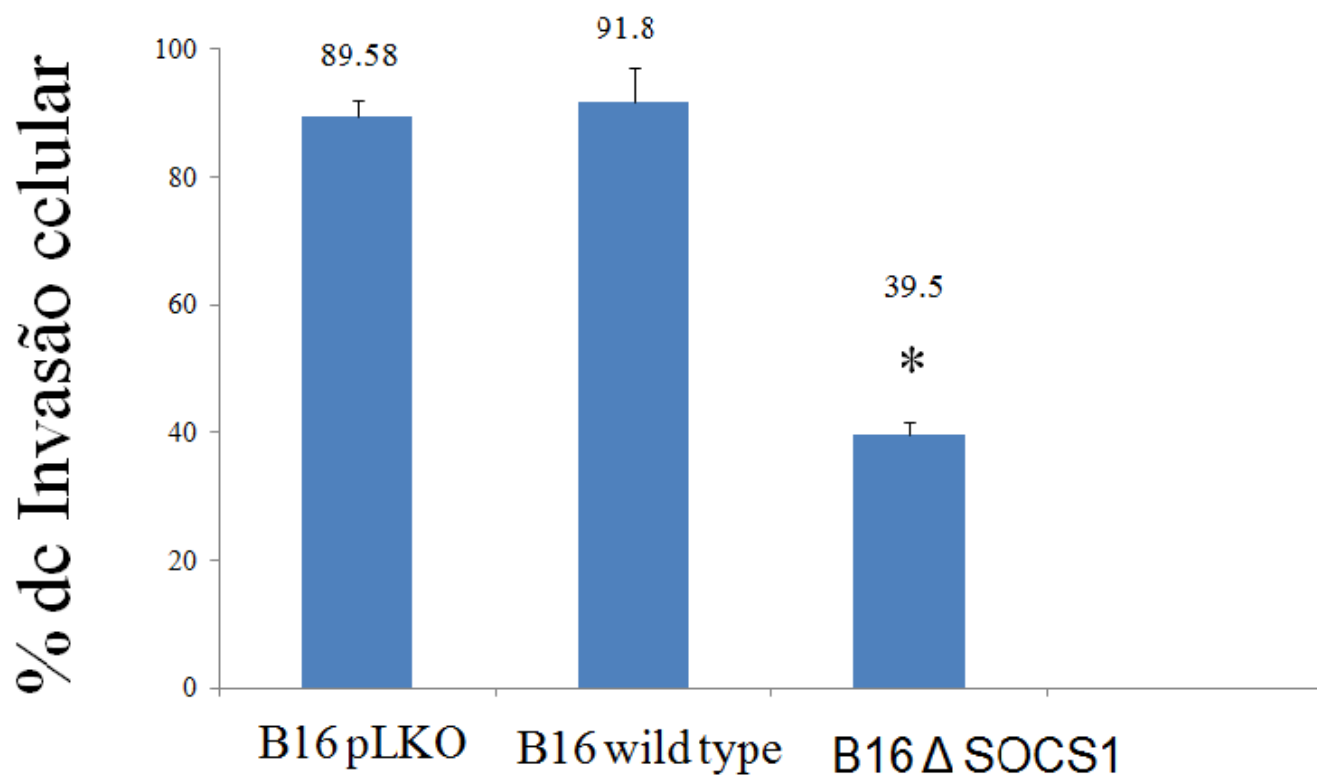


Figura 11: Ensaio de Invasão utilizando Matrigel transwell: 5×10^3 Células de cada linhagem foram plaqueadas em transwell (MATRIGEL) e SFB na base da placa. As células que ultrapassarem o transwell em direção ao SFB são consideradas células que tiveram a capacidade de invadir a matriz. O produto final do experimento (membrana) foi corado por GIEMSA e submetido à contagem em microscópio óptico 100X em cinco diferentes campos, os quais foram realizados em triplicata, sendo $p < 0.05$

Ensaio clonogênico das linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1.

A técnica do ensaio clonogênico consiste em semear um número reduzido de células por placa de modo que cada linhagem fique totalmente isolada das demais, impedindo, assim, que ocorra "cross-feeding" (uma célula complementando as carências de outra) e "condicionamento do meio" (acúmulo de substâncias secretadas pelas células propiciando o crescimento das mesmas). O objetivo é determinar quantas células plaqueadas são capazes de crescer e formar colônias macroscópicas. Por ser extremamente crítico ("stringent"), esse método é o melhor e o mais rigoroso indicador de viabilidade celular.

Buscando caracterizar a linhagem silenciada para o gene SOCS-1, 5×10^3 células de cada linhagem foram plaqueadas em meio sólido como descrito em materiais e métodos. A Figura 11 revela o número de colônias 30 dias após o plaqueamento das linhagens celulares. As células B16 pLKO e B16 wild type não apresentaram diferenças significativas quanto o número de colônias, enquanto as células que foram silenciadas para o gene SOCS-1 não foram capazes de crescer em meio sólido, evidenciando o papel da SOCS-1 no desenvolvimento e progressão dessa linhagem.

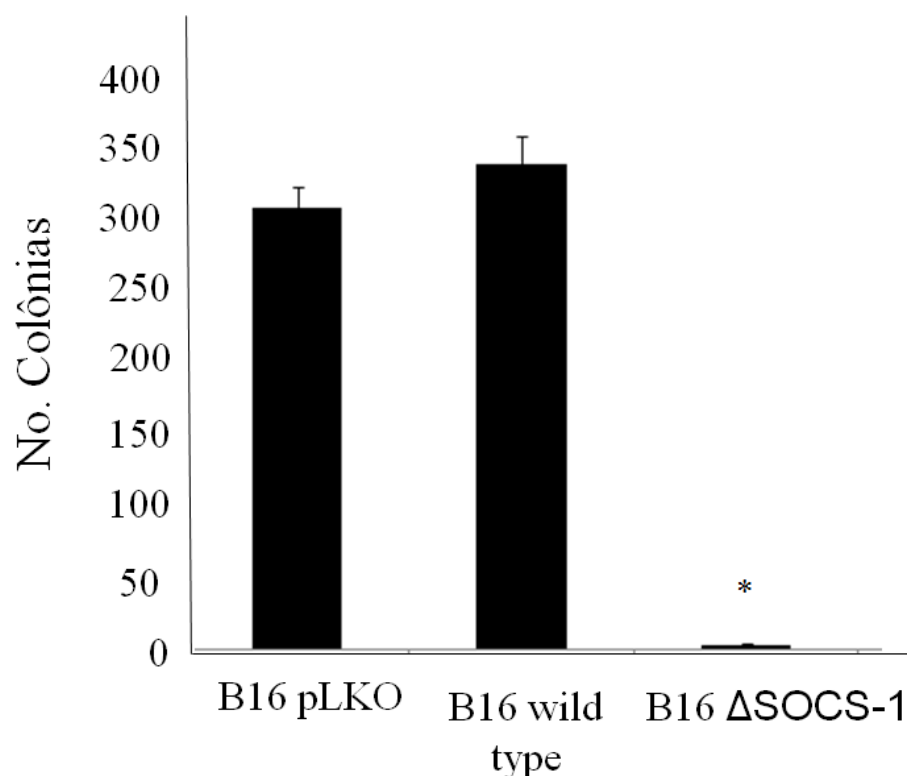


Figura 12: Ensaio clonogênico: 5×10^3 Células de cada linhagem foram plaqueadas em meio de Agarose 1%, diluído em RPMI e acrescido de 20% de SFB. Trinta dias após esse plaqueamento avaliamos o efeito do silenciamento de SOCS-1 comparando com células B16 pLKO e B16 wild type, quanto a formação de colônias visualizadas com microscopia óptica.

Análise morfológica das linhagens B16F10 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1, utilizando DAPI e faloidina.

O efeito de silenciamento de SOCS-1 foi marcante na morfologia das células tendo o núcleo corado com DAPI e o citoesqueleto com faloidina, como descrito em Materiais e Métodos. A fim de quantificar as alterações dos núcleos, a área nuclear foi calculada respeitando a área de um elipóide, $S = \pi \cdot d/2 \cdot D/2$ sendo que d é o diâmetro menor e D o diâmetro maior.

A Figura 13a revela a imagem do ensaio de fluorescência, e podemos observar que o comportamento nuclear e citosólico de ambas as linhagens B16 pLKO e B16 wild type respeitam um padrão uniforme de organização, ou seja, um diâmetro nuclear de aproximadamente $10 \mu\text{m}$. Na linhagem B16 Δ SOCS-1 pode-se observar um aumento significativo da área nuclear que foi calculada (Figura 13b) utilizando a fórmula de área de um elipsóide. Quando comparada em valores com as duas linhagens B16 pLKO e B16 wild type a linhagem silenciada tinha núcleos com áreas 2x maiores sugerindo um retardo no processo de divisão do material genético (fase S). A área corada com faloidina sugere também um aumento considerável do tamanho celular na linhagem silenciada.

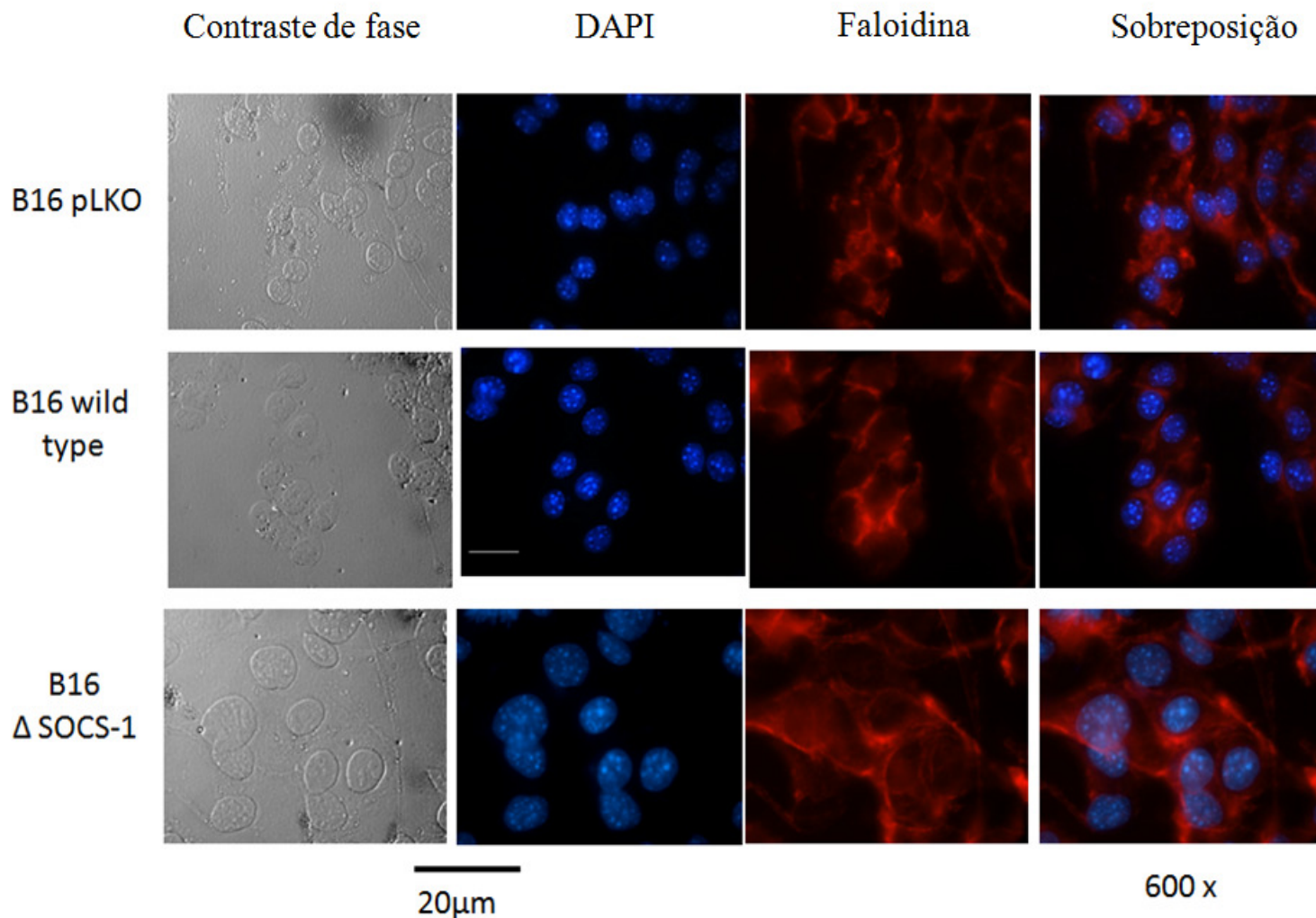


Figura 13a: Microscopia de fluorescência. Células marcadas com DAPI e faloidina. 2×10^4 Células das três linhagens foram plaqueadas em lamínulas redondas (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA) e inseridas em placas de 24 poços contendo meio RPMI suplementado com 10% de SFB até atingir a confluência de 80%. Após fixação e permeabilização as células foram coradas com faloidina-TRICT na concentração 1:1000 (Invitrogen) e 1mg/mL de DAPI (Invitrogen) diluído em PBS por 1 hora. A coloração com DAPI (azul) foi observada no comprimento de onda de excitação 350 nm e 470 nm. Para faloidina-TRICT (actina vermelha) foi usado um filtro de excitação de comprimento de onda 580 nm e emissão 620 nm. A área nuclear das células foi calculada utilizando o diâmetro das células.

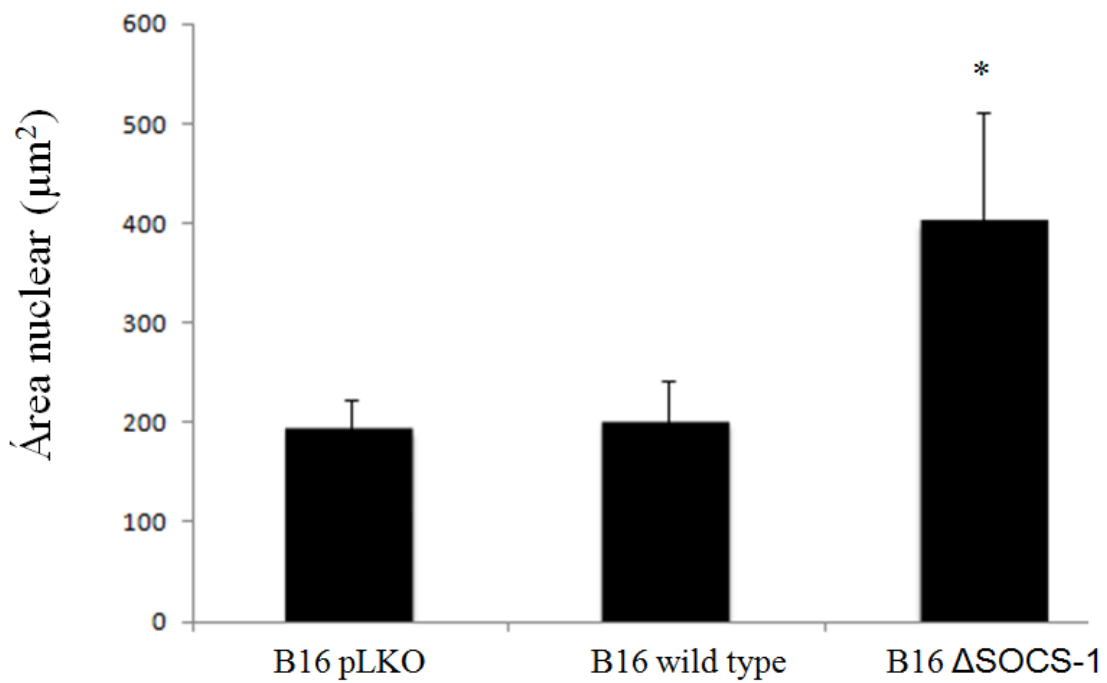


Figura 13b: Análise da área nuclear das linhagens celulares: A área nuclear das linhagens celulares foi calculada através da fórmula da área de um elipsóide respeitando a equação $S = \pi \cdot d/2 \cdot D/2$, sendo que d é o diâmetro menor e D o diâmetro maior. Os dados foram realizados utilizando as imagens fornecidas pela Microscopia de fluorescência e transformadas em dados numéricos realizados em triplicata. $p < 0.05$

Avaliação do ciclo celular nas linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1 através da citometria de fluxo (FACS).

O experimento de fluorescência revelou um aumento da área nuclear sugerindo, pois, uma alteração no ciclo celular da linhagem B16 Δ SOCS-1. As células das três linhagens foram submetidas então à marcação de PI para análise em FACS. Como podemos evidenciar na Figura 14, na linhagem silenciada para a proteína SOCS-1, houve um prolongamento da fase S (48%), comparado a 17% da linhagem B16 pLKO e da linhagem B16 wild type. Esse resultado mostra que SOCS-1 e suas vias de sinalização participam na progressão do ciclo celular com implicação direta e nos mecanismos que regem a proliferação e o crescimento desordenado das linhagens tumorais.

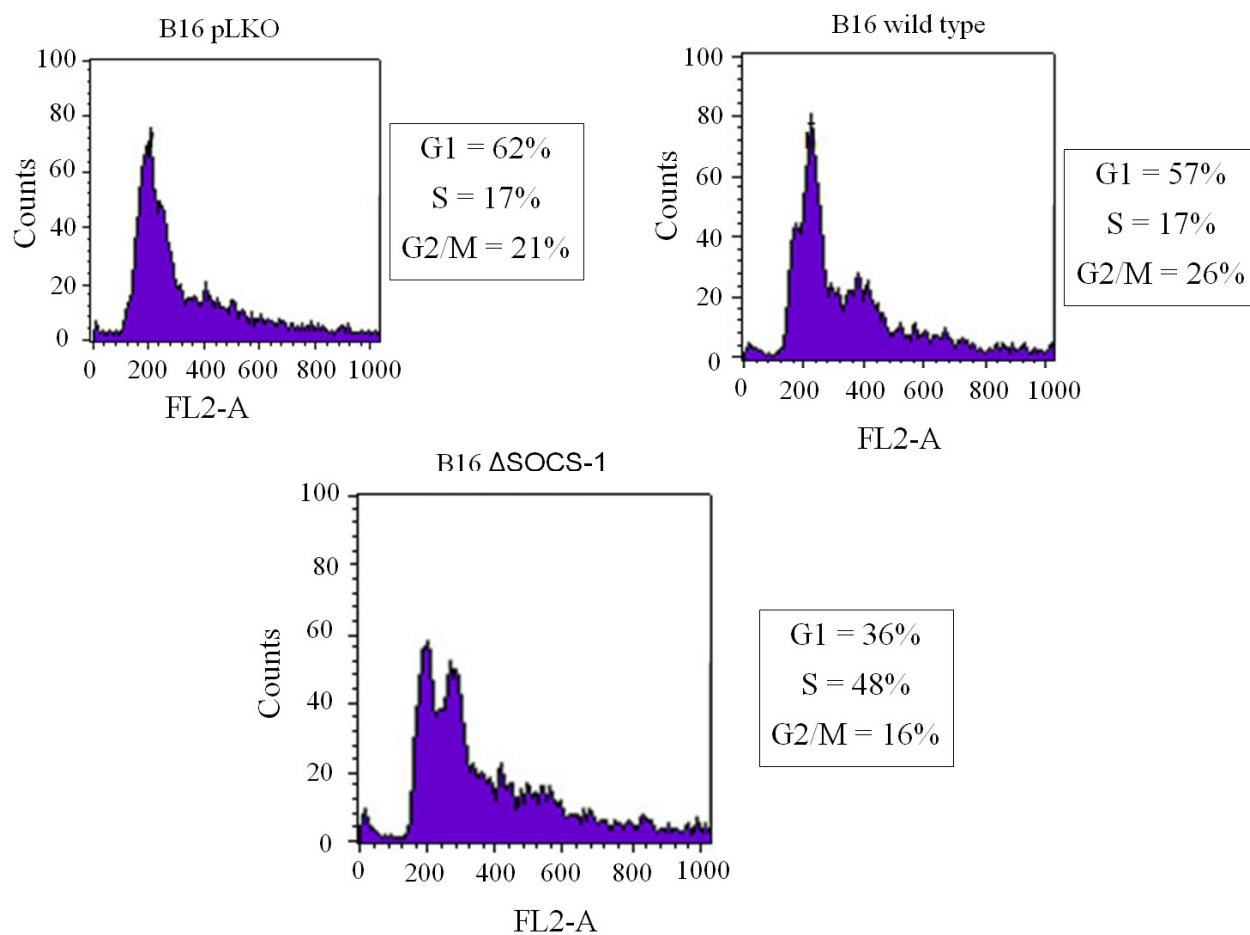


Figura 14: Análise do ciclo celular através da citometria de fluxo: As linhagens de células B16 pLKO, B16 wild type e B16 Δ SOCS-1 foram tratadas com PI e analisadas para determinar o ciclo celular por FACS. Os histogramas e as porcentagens revelam as diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2).

Avaliação da expressão de receptores de fatores de crescimento nas linhagens B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1 por citometria de fluxo (FACS).

O intuito do presente experimento foi avaliar o efeito do silenciamento da proteína SOCS-1 na expressão de receptores de fatores de crescimento indispensáveis para o fenótipo de malignidade de uma célula tumoral. Os receptores pesquisados foram: a porção α e β do receptor de insulina, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e a sua forma ativa fosforilada (p-EGFR) e receptores de fatores de crescimento de fibroblastos 3, 4 e 5 (FGFR3, FGFR4 e FGFR5). Como podemos observar na Figura 15, houve uma alteração significativa no nível de expressão celular de todos os receptores analisados na linhagem B16 Δ SOCS-1 fato este que não foi significativo quando comparadas as linhagens B16 pLKO e B16 wild type. A presença da proteína SOCS-1 parece, pois, ser essencial para que as células tumorais possam adquirir o seu caráter maligno de maior crescimento e proliferação.

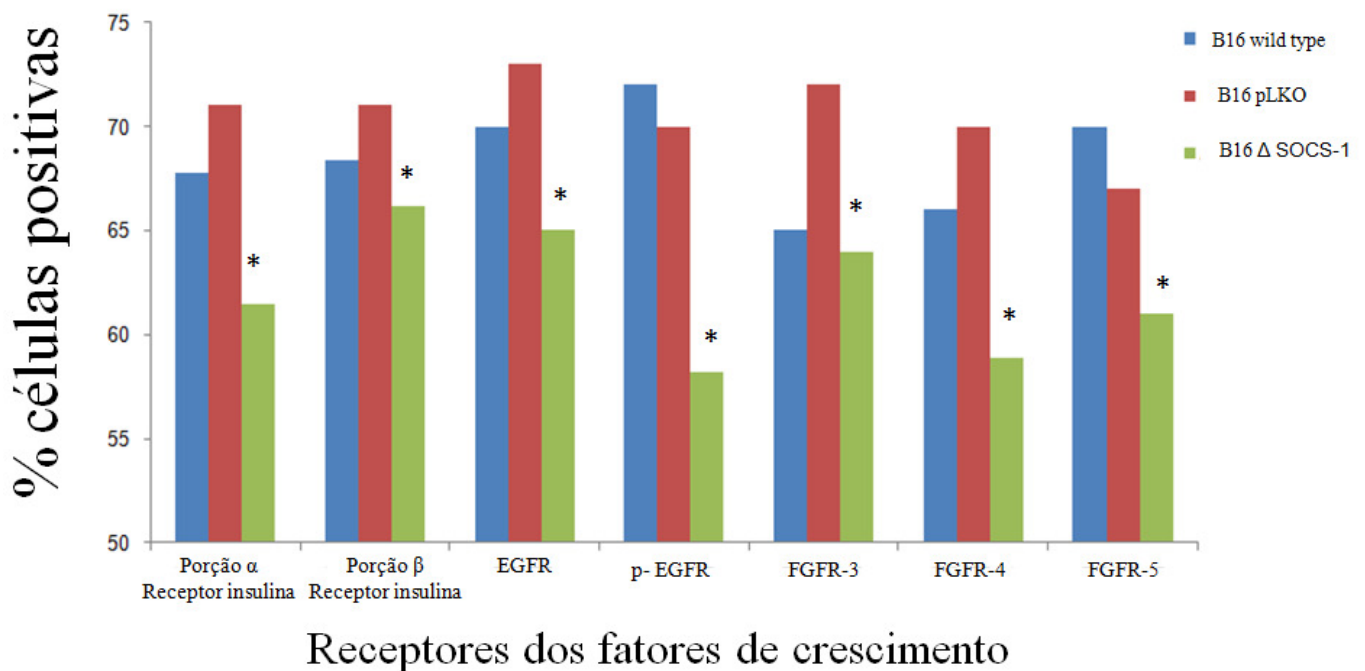


Figura 15: Análise da expressão dos receptores dos fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento tumoral de melanoma através da análise por citometria de fluxo: 5×10^4 Células de cada linhagem foram tratadas para marcação dos receptores de fatores de crescimento e utilizados anticorpos específicos na captura. É mostrada a porcentagem de células positivas expressando tais receptores. EGFR (epidermal growth factor receptor), p-EGFR (EGFR fosforilado), FGFR (fibroblast growth factor receptor)

Ensaio *in vivo*

A fim de avaliar o envolvimento da proteína SOCS-1 no modelo de melanoma, as linhagens foram testadas *in vivo*. Como podemos observar na figura 16a, através do desafio das linhagens tumorais no modelo subcutâneo e avaliação da curva de crescimento tumoral, houve um desenvolvimento tumoral mínimo em animais desafiados com a linhagem B16 Δ SOCS-1 e nulo até o 17º dia.

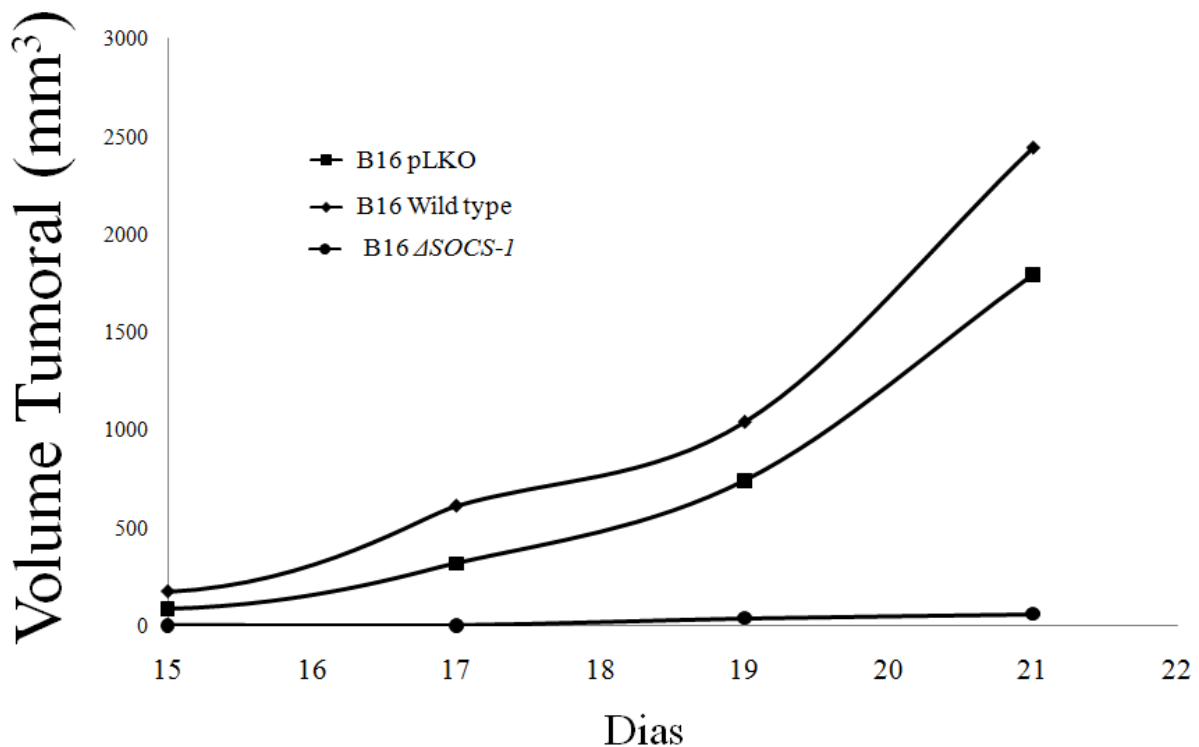


Figura 16a. Modelo *in vivo* de crescimento tumoral das linhagens B16 pLKO, B16 wild type e B16 Δ SOCS-1. 5×10^4 Células de cada linhagem foram implantadas no dorso dos animais C57/B16. Quinze dias após o desafio, os camundongos foram acompanhados em dias alternados e seus respectivos volumes

tumorais foram aferidos. O gráfico representa a média do volume tumoral dos 6 animais utilizados por grupo.. O número de camundongos utilizado para este experimento foi de 18 animais no total, sendo que foram 6 animais para cada uma das 3 diferentes linhagens, B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1. Não houve diferenças estatísticas entre as linhagens B16 pLKO e B16 wild type. Quando comparado a B16 Δ SOCS-1 o $p < 0.05$. Dados de três experimentos independentes

A curva de sobrevida para os animais desafiados com as diferentes linhagens é mostrada na Figura 16b. Observa-se um retardo significativo na morte dos animais desafiados com a linhagem B16 Δ SOCS-1. Os animais desafiados com a linhagem B16 pLKO e B16 wild type até o 21º dia estavam todos mortos, enquanto que somente 1 animal do grupo desafiado com B16 Δ SOCS-1 estava morto no 23º dia. Os outros 5 animais permaneciam vivos, sendo que somente em 2 animais havia a presença de nódulos tumorais até o 60º dia de observação.

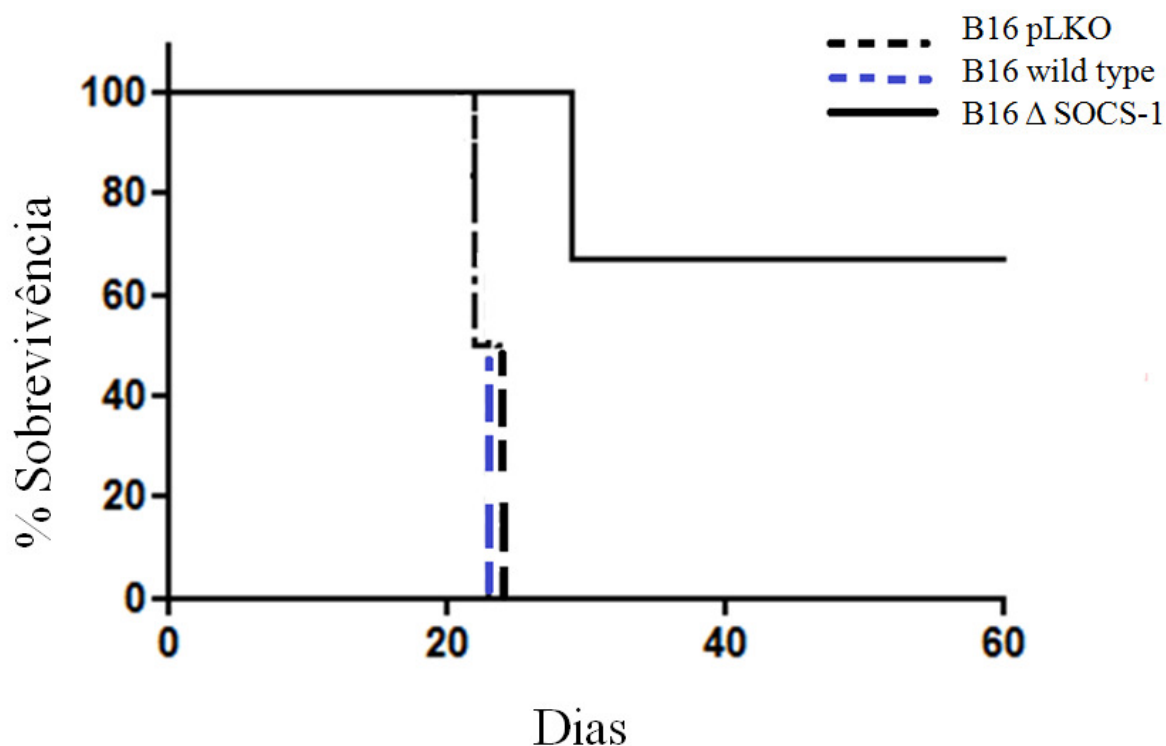


Figura 16b. Curva de sobrevida dos animais desafiados com as linhagens B16 pLKO, B16 wild type e B16 Δ SOCS-1. 5×10^4 Células de cada linhagem foram implantadas no dorso dos animais C57/B16. Os camundongos foram sacrificados quando o volume tumoral atingia 3.000 mm^3 . O número de camundongos utilizados para este experimento foi de 18 animais no total, sendo que foram 6 animais para cada uma das 3 diferentes linhagens, B16 wild type, B16pLKO e B16 Δ SOCS-1. Não houve diferenças estatísticas entre as

linhagens B16 pLKO e B16 wild type. Já quando comparado a B16 Δ SOCS-1 a diferença foi altamente significativa, $p < 0.01$. Dados de três experimentos independentes.

A seguir foi avaliada a capacidade das linhagens tumorais de colonizar os pulmões quando injetadas endovenosamente, num modelo metastático. A Figura 16c mostra a contagem de nódulos nos pulmões. As linhagens B16 pLKO e B16 wild type colonizaram todo o pulmão, atingindo um número incontável de colônias melanóticas (>300) ao contrário da linhagem B16 Δ SOCS-1 que alcançou somente uma média de 73 nódulos/pulmão em 5 animais.

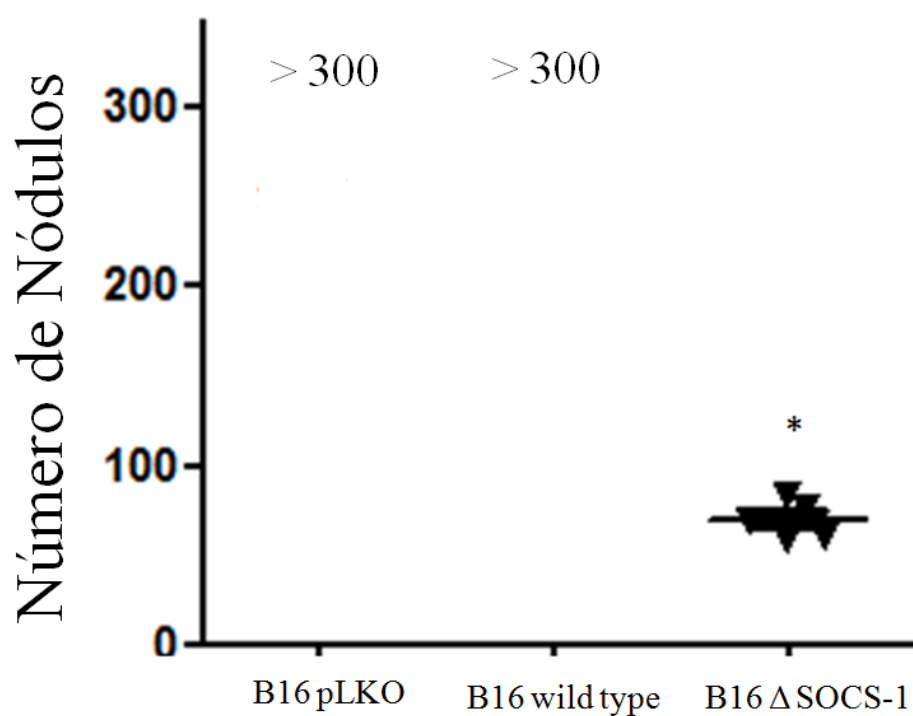


Figura 16c. Contagem de nódulos pulmonares no ensaio metastático: 5×10^5 Células de todas as linhagens foram injetadas endovenosamente na base da cauda dos camundongos de seis a oito semanas. Quinze dias após esse desafio, os camundongos foram sacrificados para contagem de nódulos pulmonares. O número de camundongos utilizados para este experimento foi de 18 animais no total, sendo 6 animais de 3 diferentes grupos, B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1. $p < 0.05$. Dados de três experimentos independentes.

No ensaio metastático *in vivo* podemos observar que as linhagens B16 pLKO e B16 wild type colonizaram eficientemente os pulmões. Uma vez silenciada a proteína SOCS-1, a linhagem B16 Δ SOCS-1 foi capaz de se instalar nos pulmões, mas com eficiência muito

menor comparado às outras linhagens. Esse resultado sugere que a proteína SOCS-1 está realmente associada não somente aos fatores inerentes da invasão, mas a outros que dificultam a sua proliferação e expansão sendo, pois, mais facilmente destruídas pelo sistema imunológico.

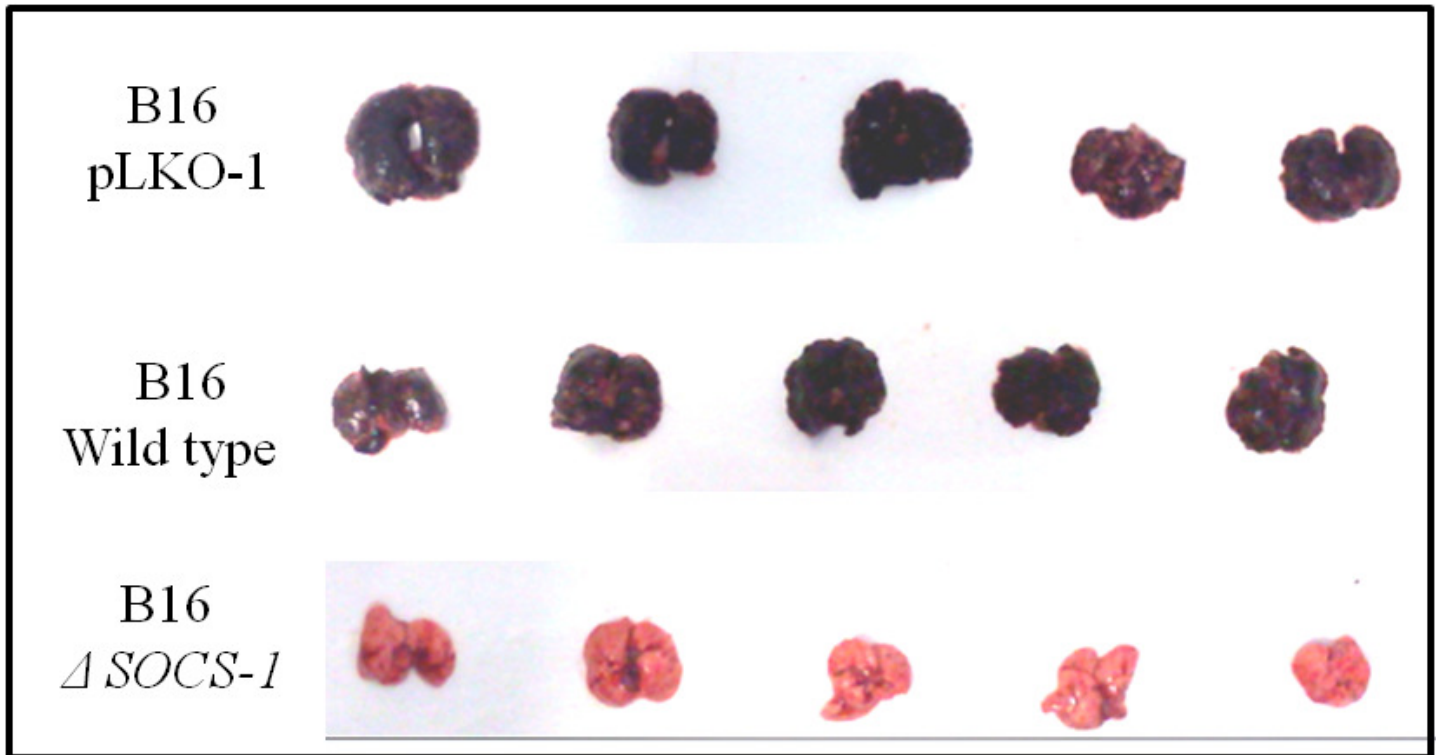


Figura 16d. Imagem dos nódulos melanóticos pulmonares no ensaio metastático: 5×10^5 Células de todas as linhagens foram injetadas endovenosamente na base da cauda dos camundongos de seis a oito semanas. Quinze dias após esse desafio, os camundongos foram sacrificados para a pesagem dos pulmões com nódulos metastáticos (incontáveis). O número de camundongos utilizados para este experimento foi de 15 animais no total, sendo 5 animais de 3 diferentes grupos, B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1. $p < 0.05$. Dados de três experimentos independentes.

A quantificação das metástases nos pulmões dos três grupos dos animais desafiados com as linhagens tumorais B16 pLKO, B16 wild type e B16 Δ SOCS-1 foi feita por pesagem dos órgãos tendo em vista que os nódulos melanóticos nos dois primeiros grupos eram em número incontável. Os pulmões foram secos e pesados. A média do peso dos pulmões dos animais de cada grupo pode ser visualizada na Figura 16e. Como podemos observar, o peso dos pulmões dos animais desafiados com as linhagens B16 pLKO e B16

wild type foi três vezes maior quando comparado com os animais controle (os quais não foram desafiados) e os animais desafiados com a linhagem B16 Δ SOCS-1.

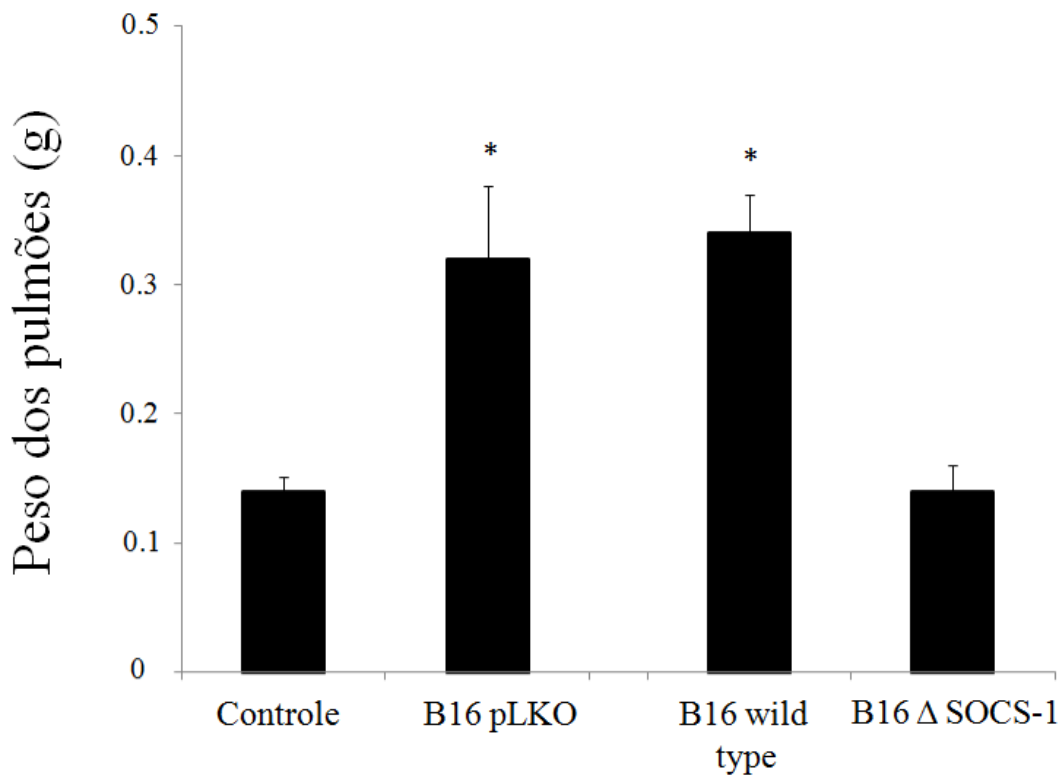


Figura 16e. Peso dos pulmões após o ensaio metastático: Os animais que foram desafiados para o ensaio metastático tiveram os seus pulmões retirados e pesados, após quinze dias. O número de camundongos utilizados para este experimento foi de 15 animais no total, sendo 5 animais em 3 diferentes grupos, B16 wild type, B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1. $p < 0.05$. Dados de três experimentos independentes.

Discussão

Os estudos envolvendo moléculas sinalizadoras têm tido um crescimento exponencial na comunidade científica. Isto porque estas moléculas não só regulam alterações pontuais em nível celular, mas são capazes de influenciar uma série de outras modificações dependendo do contexto estudado. Hoje muito se tem comentado que as células tumorais estão organizadas de forma hierárquica, similar a tecidos normais, uma teoria que inclui a noção de células-tronco tumorais (Cancer Stem Cells- CSC). Estas células apresentam um perfil altamente resistente aos diversos mecanismos quimioterápicos e na maioria das vezes são responsáveis pela recidiva tumoral e formação de metástases. Essa teoria é atraente para os pesquisadores e médicos, porque a CSC é o mecanismo central para o entendimento da biologia dos tumores e possíveis terapias do câncer. A descoberta de marcadores específicos de CSCs nos diversos tipos de câncer é particularmente importante.

Gostaríamos de enfatizar que o entendimento das diversas vias de sinalização podem conduzir a uma nova terapia com avanços cruciais na compreensão da biologia celular e molecular dos tumores, e eventualmente com resultados mais eficazes. Apesar das melhorias no tratamento médico e cirúrgico, as taxas de sobrevivência dos pacientes permanecem estáveis, em aproximadamente 15%, o que estimula a introdução de estratégias inovadoras que possam contribuir para melhorar os resultados atuais incluindo os relacionados ao melanoma maligno (Kitamura *et al.*, 2009).

O envolvimento de proteínas da família dos Supressores da sinalização de citocinas (SOCS), em especial SOCS-1 é uma linha promissora de estudos na qual o silenciamento da expressão é efetivo. Há evidências de que o silenciamento de SOCS leve ao aumento da maturação e atividade imunológica de células dendríticas em resposta a determinados agentes (Shen *et al.*, 2004), modulação mecânica de células da musculatura lisa (Dangers *et al.*, 2010) aumento da atividade antiproliferativa mediada pelos interferons em células tumorais (Takahashi *et al.*, 2008), envolvimento em metástases para o cérebro (Huang *et*

al., 2008), ativação das vias das caspases em células beta-pancreáticas (Zaitseva *et al.*, 2009), entre outros efeitos.

A escolha de uma célula tumoral justifica-se, tendo em vista que se o sistema de silenciamento gênico afetasse a primeira geração de células com a construção do shRNAi, uma biblioteca específica dessa linhagem seria estabelecida. Uma vez criada essa linhagem, poderíamos estudar com mais eficiência os efeitos do silenciamento de um determinado mediador.

Para realizar os experimentos de expressão dos transcritos de *SOCS-1* e produto final protéico SOCS-1, utilizamos como base o trabalho publicado por Li *et al.* (2004), na qual os autores demonstraram, utilizando linhagens de melanoma, que os transcritos de *SOCS-1* eram passíveis de detecção tanto em linhagem normal de melanócitos quanto em linhagens transformadas. Porém, a expressão protéica SOCS-1 só era detectada na linhagem de células transformadas. Além disso, os pesquisadores traçaram uma correlação entre o aumento da expressão de SOCS-1 em células de melanoma com o aumento do potencial invasivo, seguindo o modelo de Clark, ou seja, quanto maior o nível Clark de malignidade era presente (Clark IV e V), maior era a expressão de SOCS-1 nas amostras *in vivo* e *in situ*. Foi a partir desses dados de expressão aumentada de SOCS-1 em células transformadas que tomamos como base para a realização de nosso trabalho. Uma vez que poderíamos avaliar o efeito de uma proteína específica de alta expressão em nosso modelo de células tumorais, tornou-se possível caracterizar os eventos inerentes ao desenvolvimento e progressão tumoral, em função do silenciamento dessa proteína. A caracterização de SOCS-1 não tinha sido feita previamente em células de melanoma B16F10-Nex2. Dessa forma foi construído o sistema de silenciamento gênico permanente shRNAi, baseado em sistema de lentivírus para o silenciamento de SOCS-1.

O primeiro passo foi caracterizar os níveis de expressão tanto do fator mensagem como fator proteína, e por isso metodologias de busca para análise do transcrito e proteínas foi utilizado. O Real Time PCR (PCR em tempo real) seguido do Western Blotting foram ferramentas essenciais para mostrar que a linhagem em questão, B16 Δ SOCS-1 apresentava um silenciamento tanto no fator mensagem (mRNA) quanto no produto final (SOCS-1). Como é mostrado na Figura 1, a fim de interpretarmos o resultado do

silenciamento via mensagem, foi necessário assumir como base a expressão relativa do controle de células B17F10-Nex2 originais, ou B16 wild-type (mostrado nas barras pretas do gráfico) e assim, quando obtivéssemos a expressão do mRNA da linhagem B16 pLKO e B16 Δ SOCS-1 (barras brancas), poderíamos utilizar essa razão para expressão do nível de silenciamento. A normalização é um evento essencial, pois é através da expressão de um gene conhecido que avaliamos se a concentração de RNA total foi a mesma para todas as amostras. O produto final também foi avaliado, como mostra a Figura 2, através do resultado do Western blotting. A proteína SOCS-1 é uma proteína da família SOCS, com massa molecular de 25 kDa. A a linhagem que visava o silenciamento da proteína, B16 Δ SOCS-1, confirmou uma redução de expressão de 83% condizente com o objetivo primário desse trabalho.

A curva de crescimento para determinados ensaios celulares representa um modelo empírico da evolução de uma quantidade inicial de células que serão acompanhadas ao longo do tempo, simulando as condições de um modelo tumoral real. Vários trabalhos utilizam a cinética de crescimento para caracterizar eventos pontuais referentes aos seus modelos. Dentre alguns ensaios podemos citar a utilização da curva de crescimento em ensaios de viabilidade celular frente a drogas para tratamento de tumores de próstata (Muindi *et al.*, 2010), efeito do crescimento epitelial córneo (Borderie *et al.*, 2010), efeito antitumoral de vacinas recombinantes IL-12 (Yin *et al.*, 2010), fatores de crescimento associados a hepatite C (Marín-Serrano *et al.*, 2010), mutações de genes que causam displasias (Liu *et al.*, 2010) e efeito do crescimento celular após o silenciamento gênico na progressão de tumores de mama (Lo *et al.*, 2010). A aplicação desse modelo experimental em nosso estudo de células tumorais foi modificado por Sogayar *et al.* (2002) e é um dos principais indícios de avaliação do comportamento celular perante as taxas de crescimento e progressão tumoral. Diferentes células tumorais são dotadas de taxas de crescimento mais acelerado do que células normais, pois não possuem um sistema de checkpoints funcional, o que evidencia, entre outros fatores, o crescimento exponencial e a quebra do equilíbrio dentro de um sistema celular. Em nossa linhagem tumoral B16 Δ SOCS-1 até o período de 48 horas, houve o acompanhamento do crescimento juntamente com as demais linhagens, ambas B16 pLKO e B16 wild type. Após esse período, houve uma redução da cinética de crescimento dessa linhagem, e este fato foi acompanhado até o tempo de 120 horas. Esta

redução no crescimento não estava associada a morte celular, pois o azul de Trypan foi utilizado durante a contagem e não ocorreu morte significativa. Uma vez que as células silenciadas para SOCS-1 não se comportavam com a mesma cinética de crescimento das demais linhagens, partimos para experimentos que nos revelassem se essas células tinham a capacidade de migrar, ou seja, começamos a caracterizar fatos inerentes ao desenvolvimento e potencial maligno da célula tumoral.

O processo de migração celular desempenha um papel essencial em uma ampla variedade de fenômenos biológicos e esta envolvida em situações de normalidade, bem como eventos patológicos. A migração celular é essencial na embriogênese e em processos homeostáticos, como a resposta imune e reparação de tecidos lesados. Os processos patológicos em que a migração pode contribuir incluem doença vascular, doenças inflamatórias e metástase de tumores. O desenvolvimento do tumor é acompanhado da formação de vasos sanguíneos que decorrem da proliferação e migração de células endoteliais. Ensaio que visam avaliar o comportamento migratório celular após o processo de silenciamento de determinados genes tem sido freqüentemente explorado. Gu *et al.* (2010) avaliou a migração de células da musculatura uterina após o silenciar o gene que codifica a caponina1. Valster *et al.* (2005) avaliou o comportamento de linhagens de glioblastomas após silenciar genes que codificam proteínas Rho, através de um ensaio denominado “Monolayer wound healing assay”. No presente trabalho, o efeito do silenciamento de SOCS-1 afetou diretamente o processo de migração das células de melanoma. Determinamos um retardo na migração celular utilizando o mesmo método. A migração celular em determinados substratos depende de um conjunto de funções que envolvem o citoesqueleto e moléculas de superfície, alternando adesão, contração e extensão. Parece claro, portanto, que as vias de sinalização de SOCS-1 de alguma forma interferem no processo. A inibição da migração induzida pelo silenciamento dessa proteína e o retardo do crescimento celular fazem dessa proteína um alvo a ser explorado para o controle tumoral.

Os resultados anteriores indicavam que o silenciamento de SOCS-1 teria igualmente uma repercussão no potencial invasivo e malignidade das células de melanoma. Foi escolhido então o ensaio de invasão em Matrigel® para avaliar essa propriedade das células

tumorais silenciadas. Matrigel é o nome comercial de uma mistura protéica gelatinosa secretada por células do sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), distribuído pela BD Biosciences. Dentre os seus componentes, encontramos laminina-1, colágeno tipo IV, e outras proteínas da matriz extracelular, os quais contribuem com sinais angiogênicos e de promoção do crescimento e invasão (Kawaguchi *et al.*, 1998). Estudos demonstraram que Matrigel® levou à diferenciação celular, induziu a angiogênese e permitiu a organização tecidual. As múltiplas respostas observadas em células utilizando Matrigel® são bem compreendidas e envolvem uma variedade de mecanismos. Uma vez associadas a esse substrato as células tornam-se polarizadas, em contraste com seu comportamento nas condições de cultura convencional, pois esta técnica fornece uma membrana basal repleta de fatores angiogênicos e fatores de crescimento, que são liberados por proteases produzidas pelas próprias células tumorais. Certos peptídeos a partir de seqüências de laminina-1 têm demonstrado aumentar a angiogênese, atividade de proteases, o crescimento do tumor e metástases. No presente trabalho, mostramos uma vez mais, que o silenciamento para SOCS-1, torna a linhagem da célula tumoral muito menos invasiva. Podem estar afetados processos de aderência e reconhecimento da matriz extracelular bem como enzimas hidrolíticas indispensáveis na invasão.

Os dados obtidos no modelo metastático do melanoma murino confirmam a baixa capacidade invasiva das células tumorais silenciadas para SOCS-1 em diferença marcante com as outras linhagens ensaiadas. Como o processo metastático ou de colonização pulmonar é complexo envolvendo etapas de embolização, invasão da matriz e do parênquima, formação de colônias, angiogênese e aumento da massa tumoral, a inibição de SOCS-1 pode ter efeitos diversos resultando na baixa eficiência da colonização pulmonar. No presente estudamos um dos aspectos de implantação e formação de colônias das células tumorais usando um ensaio clonogênico.

Avaliamos a capacidade das células tumorais de formar colônias *in vitro* quando adicionadas em baixa densidade ou colocadas de maneira isolada uma das outras. Esse ensaio de sobrevivência celular é baseado na habilidade de uma única célula conseguir proliferar para formar uma colônia. Uma vez que essas células estão isoladas das demais não ocorre um "cross-feeding", ou seja, uma célula complementando as carências de outra e

um "condicionamento do meio", acúmulo de substâncias secretadas pelas células propiciando o crescimento células vizinhas. O crescimento de células tumorais em ensaios clonogênicos e os efeitos de agentes antineoplásicos sobre células tumorais foram avaliados como fatores preditivos. Os resultados destes ensaios mostraram que o crescimento em colônias estava associado com pior prognóstico e resistência às drogas. Ao longo do tempo, as pesquisas contribuíram para o aperfeiçoamento de técnicas que permitem o isolamento e a classificação molecular de células tumorais e assim, hoje, o ensaio clonogênico é uma importante ferramenta para definir um alvo terapêutico. Aqui, nós demonstramos como o silenciamento pontual de um gene que codifica uma proteína envolvida na sinalização celular foi capaz de reverter o perfil maligno característico de uma linhagem tumoral, abrindo a possibilidade de uma intervenção específica com agentes anticancerígenos experimentais (Chumsri *et al.*, 2007). O ensaio clonogênico é capaz ainda de informar sobre a resistência das células tumorais ao *anoikis*, ou seja, para que ocorra um processo metastático é necessário que células transformadas não respeitem mais os limites da ancoragem ao substrato e de adesão célula-célula. Sob condições normais, as células epiteliais que romperam esse mecanismo de ancoragem sofrem um processo de apoptose. Células metastáticas são resistentes aos mecanismos de *anoikis* e por isso apresentam esse perfil tão adaptativo. Nos ensaios clonogênicos do presente trabalho, a linhagem silenciada para proteína SOCS-1, B16 Δ SOCS-1 não teve, ao contrário das outras linhagens, a capacidade de formar colônias quando isoladas, evidenciando a importância dessa proteína no processo de viabilidade celular, reprodução, resistência à apoptose e caráter invasivo. Muitos estudos demonstram que moduladores apoptóticos cruciais estão desregulados em metástases. Essa desregulação é ativada por diversos mecanismos, dentre eles: ativação de vias de sobrevivência, por exemplo, PI3 quinase-Akt (Liotta e Kohn, 2004), superexpressão de metaloproteinases de matriz, as quais afetam a expressão de receptores de morte (Mehlen e Puisieux, 2006), liberação de fatores de crescimento e condição da matriz extracelular para a invasão (Towson, Naumov e Chambers, 2003), superexpressão de proteínas anti-apoptóticas tais como BCL-2 e BCL-XL ou quinase de adesão focal (FAK) e inativação de p53 (Douma *et al.*, 2004). A importância do mecanismo de resistência ao *anoikis* em células metastáticas foi demonstrada em estudos experimentais pela identificação funcional de moléculas supressoras de anoikis, os quais identificaram o

receptor neutrofílico TrkB como mediador chave. Células do epitélio intestinal de ratos sensíveis ao *anoikis* foram transfectadas com TrkB, tornando-se altamente tumorigênicas e metastáticas (Geiser e Peeper, 2005). O gene do TrkB é por exemplo, freqüentemente superexpressos em tumores de cólon (Bardelli, Parsons e Silliman, 2003).

Ao longo de nossos estudos, o tamanho das células da linhagem B16 Δ SOCS-1 se diferenciava das demais linhagens, mostrando dimensões maiores, particularmente os núcleos. Usando microscopia de fluorescência com DAPI e o citoesqueleto corado com faloidina, observamos um aumento nuclear duas vezes maior comparando as áreas com as outras duas linhagens celulares. Essa alteração morfológica evidenciou indiretamente que o silenciamento de SOCS-1 alterou a cinética do ciclo celular retardando a divisão entre o final da fase G1 e fase S. Em comparação às linhagens B16 pLKO e B16 wild type estudos de citometria de fluxo mostraram que na linhagem B16 Δ SOCS-1, ocorria um retardo do ciclo celular na fase S, condizente com os dados de microscopia de fluorescência e aumento da área nuclear. Não existe relato prévio descrevendo a participação das moléculas de SOCS-1 no ciclo celular de células tumorais.

Para melhor caracterizar o envolvimento da proteína SOCS-1 no contexto de malignidade das linhagens tumorais e o papel intrínseco entre as vias de sinalização e a promoção da progressão tumoral focalizamos nossa atenção na expressão de receptores de fatores de crescimento, certamente envolvidos no crescimento das células tumorais. A inibição de vias de EGFR nas células tumorais já é uma estratégia que visa interromper a progressão do ciclo celular, apoptose e processos angiogênicos (Herbst e Shin, 2002). Numerosos bloqueadores de EGFR têm sido investigados, e alguns deles já estão sendo usados clinicamente, incluindo anticorpos monoclonais anti-EGFR, inibidores da tirosina quinase (TKIs), ligantes de conjugados, imunoconjugados e oligonucleotídeos antisense (Flynn et al., 2009). No caso das células tumorais silenciadas para SOCS-1 a menor expressão de vários receptores de fatores de crescimento é condizente com sua menor capacidade proliferativa aumentando-se o tempo de incubação *in vitro*, e o menor potencial de colonização *in vivo*. Ocorreu, entre outras reduções na expressão de receptores a de fosfo-EGFR que está associado a processos metastáticos. A via da fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K)/Akt que opera “downstream” ao EGFR e HER2 está envolvida na migração celular

e sobrevivência. EGFR e HER2 estão expressos em células tumorais circulantes em 44% e 63% de pacientes com câncer de mama metastático (Sharma *et al.*, 2008) e fosfo-EGFR em 86% de pacientes com metástases EGFR-positivas.

O uso do RNAi para o tratamento do câncer pode ser visualizado como uma alternativa revolucionária para o tratamento desta doença devastadora. Os desafios que envolvem a busca da “nova cura” para os tumores não são diferentes dos enfrentados por outras doenças, e incluem as etapas de identificar bons alvos, entrega e menor toxicidade. Metas oncológicas crescem a cada dia na comunidade científica. Um dos trabalhos significativos até agora empregando RNAi para tratamento de tumores é o de Hu-Lieskovan *et al.* (2005) que utilizou nanopartículas contendo transferrina visando sarcoma de Ewing em um modelo animal. Este estudo demonstrou a viabilidade da utilização de nanopartículas não lipídicas para “delivery” dos siRNAs em um modelo de câncer, e é uma prova da utilidade de siRNAs no tratamento de tumores metastáticos. O RNAi é uma nova ferramenta que pode se tornar um meio potente para regular diversas respostas inerentes à célula tumoral tais como diferenciação, desenvolvimento, progressão e supressão de tumores, conforme foi demonstrado nesse trabalho.

Conclusões

O sistema de RNA de interferência (shRNAi) auxiliou na promoção do desenvolvimento da linhagem silenciada para a proteína SOCS-1

O silenciamento da proteína SOCS-1 forneceu forte evidência do seu papel intracelular em uma célula tumoral, implicando em efeitos básicos no desenvolvimento e progressão tumoral, migração, invasão, capacidade de formar colônias, regulação do ciclo celular e deficiência na expressão de receptores de fatores de crescimento, finalizando com a reversão da malignidade num modelo metastático *in vivo*.

SOCS-1 em modelo de melanoma apresenta-se como um alvo para ligantes/inibidores que podem ser desenvolvidos como drogas anti-câncer.

Bibliografia

Aagaard, L.; Rossi, J.J. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews* v.59, p.75-86. 2007.

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Saunders Elsevier, 6^a ed. Cap. 17, 2008. Imunidade aos Tumores.

Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J.; Ralf, M; Robberts, K; Walter, P. The cell cycle and programmed cell death In: *Molecular Biology of the cell*. Ed. Garland Science, 4^oed, p.983-1026, 2005.

Atallah, E.; Flaherty, L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol* v. 6 (3) p.185-93, 2005.

Balch, C.M., Houghton, A. N., Peters, L.J. *Cutaneous Melanoma In Cancer: Principles & Practice of Oncology*. Philadelphia: Vincent T. De Vita, Jr., Samuel Hellman, Steven A. 4^oed, 1993.

Bardelli, A.; Parsons, D.W.; Silliman, N. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* v.300 p.949-963, 2003

Belagyi, T.; Zsoldos, P., Makay R.; Issekutz, A.; Olah, A. Multiorgan resection (including pancreas) for metastasis of cutaneous malignant melanoma. *Journal of the Pancreas* v. 7 (2) p. 234-240, 2006.

Bernstein, E.; Caudy, A.A.; Hammond, S.M .; Hannon, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* v. 409, p. 363-366, 2001.

Bevan, M.J. Cross priming. *Nature Immunology* v.7 p.363, 2006

Borderie ,V.; Borderie, P.; Basli, E.; Piquemal, A.; De Sousa, C.; Goldschmidt, P.; Laroche, L.; Fialaire, A. Human limbal epithelial cell growth kinetics in vitro. *J Fr Ophtalmol*. 2010 Jun 23. [Epub ahead of print]

Brown, K.M.; Chu, C.Y.; Rana, T.M. Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nat Struct Mol Biol.* 2005

Chin, L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* v. 3 (8) p. 559-570, 2003

Chudnovsky, Y.; Khavari, P.A; Adams, A.E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* v. 115 p. 813-824, 2005.

Chumsri, S.; Phatak, P.; Edelman, M.J.; Khakpour, N.; Hamburger, A.W.; . Cancer stem cells and individualized therapy. *Cancer genomics proteomics* v. 4 p. 165-174, 2007

Colisson, E.A.; Suzuki, S.S.; Gambhir, S.S.; Kolodney, M.S. Treatment of metastatic melanoma with an orally available inhibitor of the RAS/RAF/MAPK cascade. *Cancer Research* v.63, p.5669-5673, 2003.

Dahl, C., Guldberg, P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS*, v. 115 p. 1161-1176, 2007.

Dai, D.L.; Martinka, M.; Li, G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma. A clinicopathologic study of 292 cases. *J.Clin.Oncol.* v.23, p.1473-1482, 2005.

Dangers, M.; Kyian, J.; Grote, J.; Schieffer, B.; Haller, H.; Dumler, I. Mechanical Stress Modulates SOCS-1 Expression in Human Vascular SmoothMuscle Cells. *Journal of Vascular Research* 47:432–440, 2010.

De Sepulveda, P.; Ilangumaran, S.; Rottapel, R. Supressor of cytokine 1 inhibits VAV functions trough protein degradation. *J.Biol.Chem.* v.275, p.14005-14008, 2000.

Dhawan, P.; Singh, A.B.; Ellis, D.L.; Richmond, A. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappa B and tumor progression. *Cancer Reserch*, v.62, p.7335-7342, 2002.

Dobroff AS, Rodrigues EG, Juliano MA, Friaça DM, Nakayasu ES, Almeida IC, Mortara RA, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Magliani W, Conti S, Polonelli L, Travassos LR 2010 Differential antitumor effects of IgG and IgM monoclonal antibodies and their synthetic complementarity-determining regions directed to new targets of B16F10-Nex2 melanoma cells. *Translational Oncology*, v 3 (4) p. 204-217 2010

Dobroff, A. Anticorpos monoclonais (mAbs) protetores contra o melanoma murino B16F10. Atividade antitumoral de CDRs isolados, derivados desses anticorpos. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências, 2007.

Dobroff, A., Rodrigues, E.G., Moraes, J.Z., Travassos, L.R.. Protective, anti-tumor monoclonal antibody recognizes a conformational epitope similar to melibiose at the surface of invasive murine melanoma cells. *Hybridoma and Hybridomics*, v.21 (5) p. 321-331, 2002.

Dorsett, Y; Tuschl,T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutic. *Nat. Rev. Drug. Disc.* v.3 p.318-329, 2004

Douma, S.; Van Laar, T.; Zevenhoven, J.; Meuwissen, R.; Van Garderen, E.; Peeper, D.S. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* v. 430 p.1034–1039, 2004

Dunn G.P; Old L.J; Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21(2):137- 148, 2004;

Dykxhoorn, D.M; Lieberman, J. The silent revolution RNA interference as basic biology, research tools and therapeutic. *Annu. Rev. Med.* v.55 p. 401-423, 2005

Dykxhoorn, D.M; Novina, C.D. Sharp,P. A killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nat .Rev. Mol. Cell. Biol.* v.4 p457-467, 2003

Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* v.411, p. 494-498, 2001.

Endo, T.A.; Masunhara, M.; Yokouchi, M.; Susuki, R.; Sakamoto, H.; Mitsui, K.; Tanimura, S.; Ohtsubo, M.; Misawa, H.; Leonor, N.; Taniguchi, T.; Fujita, T.; Kanakura, Y.; Komiya, S.; Yoshimura, A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, v.387 (6636), p.921-924, 1997.

Feldman, E.D; Pingpank J.F; Alexander R. Regional treatment options for patients with ocular melanoma metastatic to the liver. *Annals of Surgical Oncology* v. 11 (3) p. 290-297, 2004.

Fernandez, N. C. A. ; Lozier, C.; Flament, P; Ricciardi-Castagnoli, D.; Bellet, M.; Suter, M; Perricaudet, T.; Tursz, E.; Maraskovsky. L. ; Zitvogel. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate antitumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* 5:405. 1999.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E, Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* v. 391 (6669) p. 806-811, 1998.

Flowers, L.O.; Subramaniam, P.S.; Johnson, H.M. A SOCS-1 peptide mimetic inhibits both constitutive and IL-6 induced activation of STAT3 in prostate cancer cell. *Oncogene*, v.24, p.114-120, 2005.

Flynn, J.F.; Wong, C.; Wu, J.M. Anti-EGFR therapy: mechanism and advances in clinical efficacy in breast cancer. *J Oncol* v. 2009, p 1-16, 2009

Geiger, T.R.; Peeper, D.S. The neurotrophic receptor TrkB in anoikis resistance and metastasis: a perspective. *Cancer Res* v. 65, p.7033–7036, 2005

Gilboa, E. The promise of cancer vaccines. *Nature Biotechnology* v.22 (12), p.154-162, 2004.

Gorden, A.; Osman, I.; Gai, W.; He, D.; Huang, W.; Davidson, A.; Houghton, A.N.; Busan, K.; Polsky, D. Analysis of B-RAF and N-Ras mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Research*, v.63, p.3955-3957, 2003.

Govindarajan, B.; Sligh, J.E.; Vicent, J.; Li, M.; Canter, A.; Nickoloff, R.; Rodenburg, J.; Smeitink, A.; Oberley, L.; Zhang, Y.; Slingerland, J.; Arnold, R.S.; Lambeth, J.D.; Cohen, C.; Hilensky, L.; Griendling, K.; Martinez-Dies, M.; Cuezva, M.; Arbiser, J.L. Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *J. Clin. Invest.* v.117, p.719-729, 2007.

Gray-Schopfer, V.; Wellbrock, C.; Marais, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* v.445 (22) p.851-857, 2007.

Guo, S.; Kempfues, K.J Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*. v.81 (4) p. 611-620, 1995.

Hahn, W.C.; Weinberg, R.A. Rules for making human tumor cells: *N.Engl.J.Med*, v. 347, p. 1593-1603, 2002.

Hall, H.I.; Miller, D.R, Rogers, J.D; Bewerse, B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol.* v 40 p.35-42, 1999.

Hawes, D, Neville AM, Cote RJ. Occult metastasis. *Biomed Pharmacotherapy* 55(4): p. 229-242. Review, 2001.

Herbst, R.S.; Shin, D.M. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* v. 94, p.1593–1611, 2002

Hicks, M.J; Flaitz, C.M. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncology* v. 36 p. 152-169, 2000.

Hingorani, S.R.; Jacobetz, M.A.; Robertson, P.; Herly, M.; Tuveson, D.A. Suppression of B-Raf (V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Research*, v.63, p.5198-5202, 2003.

Huang, F.J.; Steeg, P.S.; Price, J.E.; Chiu, W.T.; Chou, P.C.; Xie, K.; Sawaya, R.; Huang, S. Molecular Basis for the critical role of suppressor of cytokine 1 in melanoma brain metastasis. *Cancer Research* v.68 (23), p.9634-9642, 2008.

Hu-Lieskovan, S., Heidel, J. D., Bartlett, D. W., Davis, M. E. & Triche, T. J. Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* v. 65, p. 8984-8992, 2005

Instituto Nacional de Câncer – Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2006, disponível em: URL: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2006/> [acessado Março de 2009].

International Agency for Research on Cancer – Estimativas da incidência e mortalidade de melanoma mundial, disponível em: URL: <http://www.iarc.fr> [acessado Março de 2009].

Jäger, D.; Jäger, E.; Knuth, A. immune response to tumor antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *J. Clin. Pathol.* V.54, p.669-674, 2001.

Joyce, J.A.; Pollard, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer* v.9, p.239-252, 2009

Kallergi G, Agelaki S, Kalykaki A, Stournaras C, Mavroudis D, Georgoulas V. Phosphorylated EGFR and PI3K/Akt signaling kinases are expressed in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Research* **10**: 80, 2008;

Kamijo, T. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci* v. 95 p. 8292-8297, 1998.

Kamura, T.; Sato, S.; Haque, D.; Liu, L.; Kaelin, Jr.; Conaway, R.C.; Conaway, J.W. The elongin BC complex interacts with the conserved SOCS box motif present in members of SOCS, Ras, WD-40 repeat and ankyrin repeat families. *Genes Dev.* v. 12 (24), p.3872-3881, 1998.

Karasarides, M.; Chilioches, A.; Hayward, R.; Niculescu-Duvaz, D.; Scanlon, I.; Friedlos, F.; Ogilvie, L.; Hedley, D.; Martin, J.; Marshal, C.; Marais, R. B-Raf is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene.* v.23, p.6292-6298, 2004.

Katz, K.A, Jonasch E, Hodi FS, Soiffer R, Kwitkiwski K, Sober AJ, Haluska FJ. Melanoma of unknown primary: experience at Massachusetts General Hospital and Dana-Farber Cancer Institute. *Melanoma Research* v. 15 (1) p. 77-82. Review, 2005.

Kawaguchi N, Toriyama K, Nicodemou-Lena E, Inou K, Torii S, Kitagawa Y. De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci. USA.* v95, p. 1062-1066 ,1998

Kim, D.; Kim, S.; Koh, H.; Yoon, O.S; Chung, K.; Cho, S.; Chung, J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J.* v.15, p.1953-1962, 2001.

Kirkwood, J.M; Ernstoff, M. Melanoma: therapeutic options with recombinants interferons. *Semin. Oncol.* v.12 (4) Suppl. 5 p.7-12, 1985.

Kirkwood, J.M; Tawbi, H.A.; Tarhini, A.A.; Moschos, S.J. Does pegylated interferon alpha-2 confer additional benefit in the adjuvant treatment of high risk melanoma? *Nat. Clin. Pract. Oncol.* v.6 (2), p.70-71, 2009.

Kitamura, H.; Okudela, K.; Yazawa, T.; Sato, H.; Shimoyamada, H. Cancer stem cell: Implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. *Lung Cancer* v.66, p. 275–281, 2009.

Knutson, K.L.; Disis, M.L.; Salazar, L.G. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother* v. 56 (3) p.271-285, 2007.

Lacronique, V.; Boueux, A.; Valle, V.D.; Poirel, H.; Quang, C.T.; Mauchauffe, M.; Berthou, C.; Lessard, M.; Berger, R.; Ghysdael, J.; Bernard, O.A. A TEL-JAK2 Fusion Protein with Constitutive Kinase Activity in Human Leukemia. *Science* v.278 p. 1309-1312, 1997

Lee, T.L.; Yeh, J.; Van Waes, C.; Chen, Z. Epigenetic modification of SOCS-1 differentially regulates STAT3 activation in response to interleukin 6 receptor and epidermal growth factor receptor signalling through JAK and/or MEK in head and neck squamous cells carcinomas. *Molecular Cancer Ther.* v.5, p.8-19, 2006.

Levine, R. Slowly enlarging lesion on the face. Surgical excision is treatment of choice for this irregular pigmented patch. *J.Biol. Chem* v.272 (44), p.27853-27861, 1999.

Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S; Wang, X. Cytochrome c and ATP dependent formation of Apaf-1/Caspase 9 complex initiates and apoptotic protease cascade. *Cell*, v.91, p.479-489, 1997.

Li, W.; Sanki, A.; Karim, R.Z; Thompson, J.F; Lee, C.S. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Royal College of Pathologists of Australia (Pathology)* v. 38(4) p. 287-301, 2006.

Li, Z.; Metze, D.; Nashed, D.; Tidow-Muller, C.; Serve, H.L.; Poremba, C.; Luger, T.A.; Bohm, M. Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling 1, in human melanoma. *Journal. Invest. Dermatol.* v.123, p. 737-745, 2004.

Liang, K.V; Sanderson S.O; Nowakowski G.S; Arora A.S. Metastatic malignant melanoma of the gastrointestinal tract. *Mayo Clin Proc* v. 81 (4) p. 511-516, 2006.

Liotta, L.A, Kohn, E. Anoikis: cancer and the homeless cell. *Nature* v. 430 p. 973–74. 2004

Liu ,Y.N.; Li, R.; Li, D.Z. Genotyping of the C742T mutation of the FGFR3 gene causing type 1 thanatophoric dysplasia by high-resolution melting analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010 Jun 23. [Epub ahead of print]

Lo, P.K.; Lee, J.S.; Liang, X.; Han, L.; Mori, T.; Fackler, M.J.; Sadik, H.; Argani, P.; Pandita, T.K.; Sukumar, S. Epigenetic inactivation of the potential tumor suppressor gene FOXF1 in breast cancer. *Cancer Res*. 15;70(14) p. 6047- 6058 Jul 2010

Mantovani, A.; Romero, P.; Palucka, A.K.; Marincola, F.M. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* v.371, p.771-783, 2008.

Marín-Serrano, E.; Rodríguez-Ramos, C.; Díaz-García, F.; Martín-Herrera, L.; Fernández-Gutiérrez-Del-Alamo, C.; Girón-González, J.A. Hepatocyte growth factor and chronic hepatitis C. *Rev Esp Enferm Dig*. v.102(6) p.365-71, Jun 2010.

Markel G, Lieberman N, Katz G, Arnon TI, Lotem M, Drize O, Blumberg RS, Bar-Haim E, Mader R, Eisenbach L, Mandelboim O. CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J Immunol*. 168(6):2803-2810, 2002

Matta, H.; Hozayev, B; Tomar, R.; Chung, P.; Chaudery, P.M. Use of lentiviral vectors for delivery of small interfering RNA. *Cancer Biol. Therapy*. v.2 (2), p.202-206, 2003

McWilliams, R.R; Rao, R.D; Brown, P.D; Link, M.J; Buckner J.C. Treatment options for brain metastases from melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther* v. 5 (5) p. 809-820. Review, 2005

Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* v. 6 p.449–458, 2006

Menard, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, C. Mateus, U. Grohmann, S. Caillat-Zucman, L. Zitvogel, and C. Robert. CTLA-4 Blockade Confers Lymphocyte Resistance to Regulatory T-Cells in Advanced Melanoma: Surrogate Marker of Efficacy of Tremelimumab? *Clin. Cancer Res.*, v. 14(16) p. 5242 – 5249, 2008

Mittal, V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat. Rev. Genetic*, v.5, p.335-365, 2004

Morgan, R.A.; Dudley, M.E.; Wunderlich, J.R.; Hughes, M.S.; Yang, J.C.; Sherry, R.M.; Royal, R.E.; Topalian, S.L.; Kammula, U.S.; Restifo, N.P.; Zheng, Z.; Nahvi, A., de Vries, C.R.; Rogers-Freezer, L.J.; Mavroukakis, S.A.; Rosenberg, S.A. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* v. 314(5796) p. 126-129, 2006.

Muindi, J.R; Yu, W.D.; Ma, Y.; Engler, K.L.; Kong, R.X.; Trump, D.L.; Johnson, C.S.; CYP24A1 Inhibition Enhances the Antitumor Activity of Calcitriol. *Endocrinology*. 2010 Jun 30. [Epub ahead of print]

Naka, T.; Narazaki, M.; Hirata, M.; Matsumoto, T.; Minamoto, S.; Aono, A.; Nishimoto, N.; Kajita, T.; Taga, T.; Yoshizaki, K.; Akira, S.; Kishimoto, T. Structure and functions of a new STAT-inducible STAT inhibitor. *Nature* v.387, p.924-929, 1997.

Napoli, C.; Lemieux, C.; Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. v. 2 (4) p. 279-289, 1990.

Pardee, A.B. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* n.246, p.603-608, 1989;

Parmiani, G., Castelli, C., Santinami, M., Rivoltini, L. Melanoma immunology: past, present and future. *Curr. Opin. Onc.*, v.19, p. 121-127, 2007.

Peeters, P.; Raynaud, S.D.; Cools, J.; Wlodarska, I.; Grosgeorge, J.; Philip, P.; Monpoux, F.; Van Rompaey, L.; Baens, M.; Van den Berghe, H.; Marynen, P. Fusion of TEL ETS variant gene 6 (ETV 6) to receptor associated kinase JAK2 as a result of t(9:12) in a lymphoid and t(9:15:12) in a myeloid leukemia. *Blood*, v.9 (7), p.2353-2540, 1997.

Polakis, P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.* v.7, p.45-51, 2007

Rankin E.B; Yu, D.; Jiang, J.; Shen, H.; Pearce, E.J; Goldschmidt, M.H.; Levy, D.E; Golovkina, T.V; Hunter, C.A.; Thomas-Tikhonenko, A. An essential role of Th1 responses and interferon gamma in infection-mediated suppression of neoplastic growth. *Cancer Biol Ther* 2(6):687-93, 2003.

Rigel, D.S; Friedman R.J; Kopf A.W. The incidence of malignant melanoma in the United States: issues as we approach the 21st century. *J Am Acad Dermatol.*v. 34: p. 839-847, 1996.

Rodolfo, M.; Daniotti M.; Vallacchi V. Genetic progression of metastatic melanoma. *Cancer Letters* v. 214, p. 133-147, 2004.

Rodrigues, E.G.; Garófalo, A.S.; Travassos, L.R. Endogenous accumulation of IFN γ in IFN-gamma-R(-/-) mice increases resistance to B16F10-Nex2 murine melanoma: a model for direct IFN-gamma anti-tumor cytotoxicity in vitro and in vivo. *Cytokines Cell Mol Ther* v. 7 p.107-116, 2003.

Rosenberg, S.A.; Dudley, M.E. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101(Suppl.2):14639-45, 2004.

Rottapel, R.; Hangumaran, S.; Neale, C.; Rose, J.L.; Ho, J.M.; Nguyen, S.; Barber, D.; Dubreuil, P.; De Sepulveda, P. The tumor suppressor activity of SOCS-1. *Oncogene* v.22, p.4351-4362, 2002.

Rudel, M.; Bockock, G. Membranes and morphological changes in apoptosis cells regulated by caspase mediated activation of PAK2. *Science*, vol.276, p.1571-1574, 1997.;

Ruoslahti, E. Specialization of tumor vasculature: *Nat.Rev Cancer*, v. 2, p. 83-90, 2002.

Seruga, B.; Zhang, H.; Bernnstein, L.J; Tannock, I. Cytokines and their relationship to the symphoms and outcome of cancer. *Nature Reviews Cancer*. v.8 p. 887-899, 2008.

Shadidi, M.; Sioud, M. Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells: *FASEB J.*, v. 17, p. 256-258, 2003.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832):1107-11.

Sharma, P.S.; Sharma, R.; Tyagi, T. Receptor tyrosine kinase inhibitors as potent weapons in war against cancers. *Curr Pharm Des* v.15, p.758–776, 2009

Shen, L; Kabler, K.E; Strube, R; Chen, S.Y. Silencing of SOCS-1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nature Biotechnology*. v.12, n°12, p.1546-1553, 2004.

Shimkin, M.B. *Contrary to nature*. Washington (D.C) Department of Health. Education and Welfare, 1977;

Slee, E.A; Harte, M.T; Kluck, R.M; Wolf, B.B; Casiano, C.A; Newmeyer, D.D; Wang, H.G; Reed, J.C; Nicholson, D.W; Alnemri, E.S; Green, D.R; Martin, S.J. Ordering the Cytochrome c initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases 2,3,6,7,8 and 10 in caspase 9 dependent manner. *J. Cell. Biol*, v.144, p.281-292, 2009;

Slominski, A.; Zjawiony J.; Wortsman J.; Semak I, Stewart J.; Pisarchik A.; Sweatman T.; Marcos J.; Dunbar C.; Tuckey R.T . A novel pathway for sequential transformation of 7-

dehydrocholesterol and expression of the P450scc system in mammalian skin. *Europ J Biochem* 271, 4178-4188, 2004.

Smith, M.; Godfrey, D. NKT cells and tumor immunity- a double edge sword. *Nature Immunology* v.1(6), p.459-460, 2000.

St Croix, B. C; Rago, V.; Velculescu, G.; Traverso, K. E; Romans, E.; Montgomery, A.; Lal, G. J.; Riggins, C.; Lengauer, B.; Vogelstein, K. W; Kinzler, P . Genes expressed in human tumor endothelium: *Science*, v. 289, p. 1197-1202, 2000.

Staquicini, F.I.; Tandle, A.; Libutti, S.K.; Sun, J.; Zigler, M.; Bar-Eli, M.; Aliperti, F.; Pérez, E.C.; Gershenwald, J.E.; Mariano, M.; Pasqualini, R.; Arap, W.; Lopes, J.D. A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. *Cancer Res* 68(20):8419- 8428, 2008.

Starr, R.; Wilson, T.A; Viney, E.M.; Murray, L.J.; Rayner, J.R.; Jenkins, B.J.; Gonda, T.J.; Alexander, W.S.; Metcalf, D.; Nicola, N.A.; Hilton, D.J. A family of cytokine inducible inhibitors of signalling. *Nature* v.387 (6636), p.917-920, 1997.

Steelman, L.S.F.; Bertrand, F.E.; Mc Cubrey, J.A. The complexity of PTEN: Mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Exp. Opin. Ther. Targets*, v.8, p.537-550, 2004.

Takahashi, Y.; Kaneda, H.; Takasuka, N.; Hattori, K.; Nishikawa, M.; Takakura, Y. Enhancement of antiproliferative activity of interferons by RNA interference-mediated silencing of SOCS gene expression in tumor cells. *Cancer Sci*, v.99 (8), p.1650-1655, 2008.

Thompson, J.F; Scolyer, R.A; Kefford, R.F. Cutaneous melanoma. *Lancet* v. 365 p. 687-701, 2005.

Townson, J.L.; Naumov, G.N.; Chambers, A.F. The role of apoptosis in tumor progression and metastasis. *Curr Mol Med* v.3 p.631–642 2003

Tyers, M. Cell cycle goes global. *Current opinion in cell biology*. 16^{ed}, p.602-613, 2004;

Tyers, M.; Rottapel, R. VHL: A very hip ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.96, p.12230-12232, 1999.

Utikal, J.; Udart, M.; Leiter, U.; Peter, R.U; Krahn, G. Additional cyclin D(1) gene copies associated with chromosome 11 aberrations in cutaneous malignant melanoma. *Int J Oncology* v. 26 p. 597-605, 2005.

Valster, A.; Tran, N.L.; Nakada, M.; Berens, M.E.; Chan, A.Y.; Symons, M. Cell migration and invasion assays. *Methods* v. 37(2) p. 208-215, Oct 2005

Van der Krol, A.R.; Mur, L.A.; Beld, M.; Mol, J.N.; Stuitje, A.R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. v. 2 (4) p. 291-299, 1990.

Veeman, M.; Axerold, T.J.; Moon, R.T. A second canon: Functions and mechanism of β -catenin-independent Wnt signalling. *Dev. Cell* v.5, p.367-377, 2003.

Vence, L.; Palucka, A.K.; Fay, J.W.; Ito, T.; Liu, Y.J.; Banchereau, J.; Ueno, H. Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 104 (52), p. 20884-20889, 2007.

Walker, G.J; Flores, J.F; Glendening, J.M; Lin, A.H; Markl, I.D. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* v. 22 p. 157-163, 1998.

Yin, X.; Yan, X.; Yang, Q.; Cao, H.; Liang H. AntiTumor mechanism of recombinant murine interleukin-12 vaccine. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010 v. 25(3) p. 263-268, Jun 2010.

Yoshikawa, H.; Matsubara, K.; Qian, G.S.; Jackson, P.; Groopman, J.D.; Manning, J.E.; Harris, C.C.; Herman, J.G. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat. Genet.* v. 28 (1), p.29-35, 2001

Yoshimura, A.; Naka, T.; Kubo, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature* v 7, p.454-465, 2007.

Yu, P.; Fu, Y.X. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest* v. 86 (3) p.231-254, 2006.

Zaitseva II.; Hultcrantz, M.; Sharoyko, V.; Flodström-Tullberg, M.; Zaitsev, S.V.; Berggren, P.O. Suppressor of cytokine signaling-1 inhibits caspase activation and protects from cytokine-induced beta cell death. *Cell Mol Life Sci* Dec;66(23):3787-95 2009.

Zamore, P.D.; Tuschl, T.; Sharp, P.A.; Bartel, D.P. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* v. 101, p. 25-33, 2000.

Zhang, J.G.; Farley, A.; Nicholson, S.E.; Wilson, T.A; Zugaro, L.M.; Simpson, R.J.; Moritz, R.L.; Cary, D.; Richardson, R.; Hausmann, G.; Kile, B.J.; Kent, S.B.; Alexander, W.S.; Metcalf, D.; Hilton, D.J.; Nicola, N.A.; Baca, M. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 96, p.2071–2076, 1999.

Zhang, S.; Huang, W. Dendritic cell based genetic immunization stimulates potent tumor protection dependent on CD8 CTL cells in the absence of autoimmunity. *J Cancer Res Clin Oncol* 134(9):987-94, 2008.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Kroemer, G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Rev. Immun.*, v. 8, p. 59-71, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)