

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio

**AVALIAÇÃO DE QUIMIOCINAS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DA
METÁSTASE CEREBRAL DE MELANOMA.**

Recife

2019

Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio

**AVALIAÇÃO DE QUIMIOCINAS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DA
METÁSTASE CEREBRAL DE MELANOMA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Co-orientadora: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira
Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CR

Sampaio, Maria Clara Pinheiro Duarte

Avaliação de quimiocinas no estabelecimento *in vitro* da metástase cerebral de melanoma /
Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio. – 2019.

42 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Michelly Cristiny Pereira.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife,
2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Pele – Câncer. 2. Metástase. 3. Cérebro – Doenças. I. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (Orientador). II. Pereira, Michelly Cristiny (Coorientadora). III. Pitta, Maira Galdino da Rocha (Coorientadora) IV. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 197

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SAMPAIO, Maria Clara Pinheiro Duarte

Título: AVALIAÇÃO DE QUIMIOCINAS NO ESTABELECIMENTO *IN VITRO* DA METÁSTASE CEREBRAL DE MELANOMA.

Defesa de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 21/01/2019

Banca Examinadora

Profª. Dra. Dayane Aparecida Gomes
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Teresinha Gonçalves Da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Cristiane Moutinho
Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele de baixa incidência e com grande potencial metastático, onde um dos seus sítios metastáticos frequentes é o cérebro. Pacientes com esse tipo de metástase apresentam maiores limitações e perda de qualidade de vida, além de os tratamentos ainda serem apenas paliativos. Sabe-se que moléculas inflamatórias, como as quimiocinas, podem guiar o tumor no desenvolvimento de metástases. Assim, é necessário entender como as interações celulares estão envolvidas no desenvolvimento da metástase cerebral. Para compreender este processo, uma cultura primária de células corticais cerebrais mistas foi realizada juntamente com as linhas de melanoma SKMEL-28 e o teste do meio condicionado, seguido de imunofluorescência para determinar as células de melanoma não alterou suas características na presença do meio condicionado. Em seguida, foi analisado como o SKMEL-28 migrou na presença do meio condicionado da cultura primária. As quimiocinas CXCL10 / IP10, CCL2 / MCP-1, CXCL9 / MIG, CCL5 / RANTES e CXCL8 / IL8 foram analisadas para determinar o perfil de quimiocinas produzidas pelo melanoma em resposta ao que foi secretado pela cultura primária. Após caracterizar a secreção dessas quimiocinas, observou-se que a quimiocina IP10 foi secretada de forma mais distinta quando o SKMEL-28 é colocado em contato com meio condicionado da cultura primária mista e que os fatores secretados pelo meio inibiram a secreção de IL8. Para entender seu papel na metástase, analisamos os efeitos do silenciamento IP10 no SKMEL-28. O ensaio *transwell* demonstrou uma invasão diminuída do SKMEL-28 como um efeito de silenciamento. O estudo indica que IP10 e IL8 são quimiocinas subjacentes à metástase cerebral do melanoma, pois estão envolvidas na migração celular e são moduladas pelos fatores solúveis do nicho cerebral pré-metastático.

Palavras-chave: Quimiocina. Metástases cerebrais. Câncer de pele.

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer of low incidence and with great metastatic potential, where one of its frequent metastatic sites is the brain. Patients with this type of metastasis present greater limitations and loss of quality of life, besides the treatments are still only palliative. It is known that inflammatory molecules, such as chemokines, can guide the tumor in the development of metastases. Thus, it is necessary to understand how cellular interactions are involved in the development of cerebral metastasis. To understand this process, a primary culture of mixed cerebral cortical cells was performed along with the SKMEL-28 melanoma lines and the conditioned medium test, followed by immunofluorescence to determine the melanoma cells did not change their characteristic in the presence of the conditioned medium. Then it was analyzed how the SKMEL-28 migrated in the presence of the conditioned medium of the primary culture. The chemokines CXCL10 / IP10, CCL2 / MCP-1, CXCL9 / MIG, CCL5 / RANTES and CXCL8 / IL8 were analyzed to determine the chemokine profile that was produced by melanoma in response to what was secreted by the primary culture. After characterizing the secretion of these chemokines, it was observed that the chemokine IP10 was secreted more differently when SKMEL-28 is contacted with conditioned medium from the mixed primary culture and that the factors secreted by the medium inhibited the secretion of IL8. To understand its role in metastasis, we analyzed the effects of IP10 silencing on SKMEL-28. The transwell assay demonstrated a decreased invasion of SKMEL-28 as a silencing effect. The study indicates that IP10 and IL8 are chemokines underlying melanoma brain metastasis, as they are involved in cell migration and are modulated by the soluble factors of the pre-metastatic brain niche.

Keywords: Chemokines. Cerebral metastases. Skin cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Progressão do melanoma	14
Figura 2-Processo de formação da metástase cerebral.	18
Figura 3- Desenho experimental do ensaio do meio condicionado.....	21
Figura 4- Cultura primária cerebral cortical mista e linhagens de melanoma.....	25
Figura 5- Co-cultura das linhagens de melanoma sobre a cultura primária mista.....	26
Figura 6- Linhagens de melanoma com meio condicionado de células da cultura mista.....	26
Figura 7- Caracterização dos níveis de quimiocinas pela linhagem UACC62.....	28
Figura 8- Caracterização dos níveis de quimiocinas pela linhagem SKMEL-28.....	29
Figura 9- Secreção de quimiocina pela linhagem SKMEL-28 silenciada.....	30
Figura 10- Invasão das células da linhagem SKMEL-28 em contato com o meio condicionado da cultura primaria mista.	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO.....	10
1.1.1 Objetivo Geral	10
1.1.2 Objetivos Específicos	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 A PELE E O MELANOMA.....	11
2.2 EPIDEMIOLOGIA	12
2.3 FISIOPATOLOGIA	13
2.4 QUIMICIONAS E MELANOMA	15
2.5 METÁSTASE E METÁSTASE CEREBRAL.....	16
3 METODOLOGIA	19
3.1 ANIMAIS.....	19
3.2 CULTURAS PRIMÁRIAS CORTICAIS MISTAS	19
3.3 LINHAGENS DE MELANOMA	19
3.4 CO-CULTURA DAS LINHAGENS TUMORAIS E PRIMÁRIAS MISTAS	20
3.5 ENSAIO DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS PRIMÁRIAS MISTAS SOBRE AS LINHAGENS DE MELANOMA	20
3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	21
3.7 DOSAGEM DE QUIMIOCINA	22
3.8 ENSAIO DE SILENCIAMENTO.....	22
3.9 ENSAIO DE INVASÃO POR <i>TRANSWELL</i>	23
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4 RESULTADOS	24
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DA CULTURA MISTA E LINHAGENS TUMORAIS	24
4.2 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CO-CULTURAS	25
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS QUIMIOCINAS PRODUZIDAS NO MODELO <i>IN VITRO</i> DE METÁSTASE CEREBRAL	27
4.4 SILENCIAMENTO DA QUIMIOCINA MAIS DIFERENCIALMENTE EXPRESSA NAS CONDIÇÕES DE MEIO CONDICIONADO (MC).....	29
4.5 CONSEQUÊNCIAS FUNCIONAIS DO SILENCIAMENTO DA IP10 NAS CONDIÇÕES DE MC	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	34
REFERENCIAS	35
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>Steroids</i> (2017)	38

.....	38
APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>Immunology Letters</i> (2018).....	39
APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>Journal of Molecular Graphics and Modelling</i> (2019).....	40
APÊNDICE D - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA <i>CYTOKINE</i> (2019).....	41
ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÈTICA.....	42

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer de pele caracterizado por uma alta letalidade e que se origina nos melanócitos, células da epiderme e que são responsáveis pela produção da melanina. O principal agente responsável para o desenvolvimento da doença é a alta exposição à radiação solar, em especial a radiação ultravioleta, a qual gera alterações no DNA dos melanócitos, transformando os mesmos em células tumorais (ISOLA; EDDY; CHEN, 2016).

A alta agressividade, característica do melanoma, deve-se principalmente ao seu grande potencial metastático, atingindo preferencialmente órgãos distantes como o cérebro. O desenvolvimento dessa metástase representa um prognóstico reservado, causando problemas neurológicos, diminuindo a qualidade de vida dos pacientes, além de representar alta taxa de mortalidade (INCA,2017).

O processo do estabelecimento da metástase cerebral do melanoma ainda não está bem estabelecido. Contudo, acredita-se que a inflamação desempenha um papel importante nesse processo, atuando como um gatilho para a carcinogênese de pele. Estudos acreditam que receptores de quimiocinas e seus ligantes estão relacionados com o estabelecimento do nicho pré-metastático no órgão secundário (KLEIN et al., 2015a; MARU; GANDHI; RAMCHANDANI,et al., 2014).

Entre as quimiocinas envolvidas, a interleucina 8 (CXCL8/IL8) tem sido relacionada com diversos mecanismos pró-tumorais, como aumento da proliferação e migração das células neoplásicas e favorecimento da angiogênese (SANMAMED et al., 2014). Essa molécula, também encontra-se relacionada com a agressividade do melanoma (GABELLINI et al., 2017). Outra quimiocina envolvida com a metástase do melanoma é a CXCL10/IP10. Ela foi encontrada elevada em níveis séricos de pacientes com melanoma avançado, tornando-se um possível marcador de mau prognóstico para melanoma (NEAGU; CONSTANTIN; LONGO, 2015).

Nos estudos realizados para compreender a metástase cerebral *in vitro*, comumente são usadas culturas de astrócitos isolados (BARROS et al,2014,(KLEIN et al., 2015a). Entretanto, esse modelo garante apenas o estudo das interações das células neoplásicas com os astrócitos, não sendo capaz de mimetizar o tecido cerebral como um todo, limitando os estudos das interações celulares. (CHUNG et al., 2017) . Dessa forma, acreditamos que a melhor maneira de simular esse ambiente *in vitro* seria com uma cultura que permita a presença e interações

celulares da maior parte das células existentes no tecido cerebral. Pela importância das quimiocinas no processo metastático do melanoma, o presente trabalho buscou analisar as diferentes interações mediadas pelas quimiocinas entre as células tumorais e o microambiente metastático em um modelo de metástase cerebral *in vitro*.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de quimiocinas em um modelo *in vitro* de metástase cerebral de melanoma.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a expressão de quimiocinas em um modelo *in vitro* de metástase cerebral
- Identificar a quimiocina mais diferencialmente expressa no modelo
- Avaliar as consequências funcionais do silenciamento da quimiocina mais diferencialmente expressa no modelo de metástase *in vitro*

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A PELE E O MELANOMA

A pele é o maior órgão que constitui o corpo humano e tem como principal função a proteção contra agentes externos. Ela é constituída por diferentes camadas, sendo as principais a derme e a epiderme. A derme é a camada mais interna da pele, formada por células pluripotentes, parecidas com as células-tronco da crista neural (NCSC; do inglês: *Neural Crest Stem Cells*) (CICHOREK et al., 2013).

A epiderme é formada pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado tendo como células principais os queratinócitos, que são responsáveis pela produção da queratina e pela homeostase tecidual, atuando no controle do crescimento dos melanócitos, células que também constituem a epiderme. (ELSHOLZ et al., 2014) .

Os melanócitos são células que apresentam forma oval ou fusiforme e são identificados por proteínas específicas, como o fator de transcrição de microftalmia (MITF). Eles apresentam organelas chamadas melanossomas, que são responsáveis pela produção da melanina, proteína que determina a pigmentação da pele. A melanina, além de garantir a pigmentação da pele, tem como função proteger a pele contra a radiação ultravioleta (UV) que pode alterar o DNA celular (CICHOREK et al., 2013).

A transformação dos melanócitos em células neoplásicas originam o melanoma de duas diferentes formas, tendo como agente externo o excesso da radiação UV. Uma das formas é a direta, que ocorre através de várias mutações nos proto-oncogene, incluindo os genes supressores de tumor TP53, NF1 e fosfatase e homólogo de tensinas (PTEN). A outra forma de transformação dos melanócitos em células neoplásicas é com o surgimento dos nevos benignos, que envolve a mutação no gene BRAF e 80% dos casos. O tumor permanece benigno até o segmento de novas mutações, transformando o mesmo em células neoplásicas (LEONARDI et al., 2018).

As células-tronco da crista neural originam os melanócitos durante o desenvolvimento embrionário. Por esse motivo, um estudo demonstrou que a célula de melanoma é mais parecida com as células-tronco da crista neural do que com os melanócitos. Essas semelhanças incluem a sua capacidade migratória e expressão de marcadores de superfície de membrana (FUKUNAGA-KALABIS *et al.*, 2015). Contudo, as células de melanoma não respondem a sinais de diferenciação, refletindo na capacidade de proliferação, metástase e resistência às terapias (WANG, FUKUNAGA- KALABIS e HERLYN, 2016).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo e de mais alta incidência, apesar da baixa letalidade. Nos Estados Unidos da América (EUA), os casos de melanoma representam 4% de todas as novas neoplasias; no Japão a incidência é de aproximadamente 0,93 por 100.000 habitantes (HATANO *et al.*, 2018). A maior incidência de melanoma no mundo encontra-se em países da Austrália e Nova Zelândia (STEWART; WILD, 2014). O número de óbitos por essa neoplasia no mundo é de 31.390; e, para as mulheres, 24.098 (FERLAY *et al.*, 2013).

O Brasil apresenta o mesmo perfil de incidência do melanoma, com 2.920 casos novos em homens e 3.340 casos novos em mulheres no ano de 2018. Em 2015, os casos de óbito no Brasil foram de 1.012 em homens e 782 em mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2017).

Os pacientes, quando diagnosticados em estágios iniciais da doença, possuem chances de cura que chegam a 92% e taxa de sobrevivência de dez anos de 89% (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Contudo, estágios avançados envolvendo principalmente a metástase, consistem em um prognóstico reservado no qual as taxas de sobrevida em cinco anos caem de 98% para 17%. Esses pacientes apresentam sobrevida média global de apenas 6 a 9 meses (LIU *et al.*, 2017). O melanoma tem como principais sítios metastáticos o pulmão e o cérebro (ISOLA; EDDY; CHEN, 2016), em que 44% de pacientes com melanoma metastático vão desenvolver metástase cerebral, com 20-54% das mortes. (CHANPIMOL *et al.*, 2017a).

Como ocorre nos principais tipos de câncer de pele, o melanoma tem a radiação ultravioleta (UV) como um importante fator no seu desenvolvimento, no entanto, não é o único. Outros fatores estão envolvidos, entre eles: idade, sexo, histórico familiar de melanoma e susceptibilidade para o desenvolvimento desse tipo de câncer. A existência do nevo melanócito prévio está envolvido com cerca de 20% a 30% dos casos de melanoma. (INCA,2017).

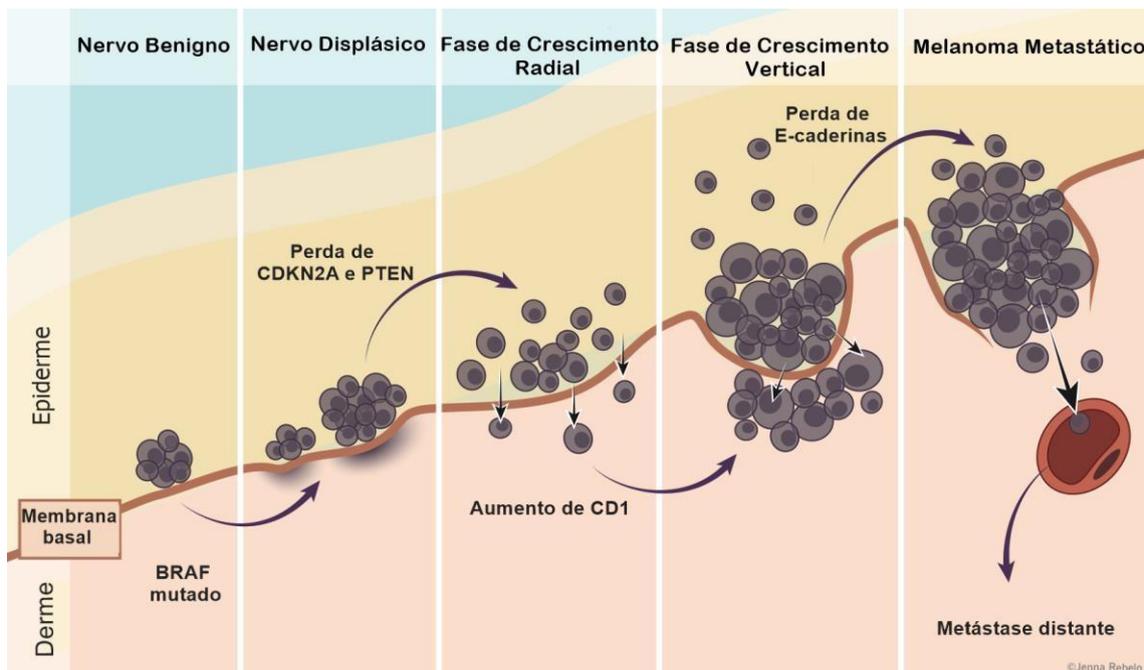
2.3 FISIOPATOLOGIA

Como foi relatado acima, a exposição crônica à radiação UV está envolvida no desenvolvimento do melanoma. As regiões mais suscetíveis a exposição são as mais afetadas, como: bochechas, pescoço, braços e mãos, tanto em homens como em mulheres (INGRAFFEA, 2013). Os raios UV têm a capacidade de penetrar as camadas da pele ocasionando alterações no DNA, afetando a homeostase dos melanócitos e modulando a expressão de diversos genes, como os supressores de tumor e os oncogenes (ANDRZEJ, T. et al. 2017).

O processo de transformação do nevo benigno no melanoma metastático ocorre de forma gradual. Primeiramente, existe a transformação do nevo benigno em um nevo displásico. Posteriormente, os melanócitos transformados adquirem capacidade de se proliferarem horizontalmente na epiderme, formando lesões atípicas (melanoma in situ). As células adquirem capacidade de invadir a derme, assim iniciando a fase de crescimento vertical. Essas células apresentam grande poder invasivo e alto poder metastático, atingindo principalmente órgãos distantes como pulmão e cérebro (ISOLA; EDDY; CHEN, 2016), como ilustra a figura 1.

As transformações descritas acima são reguladas por oncogenes, que ativam vias de sinalização envolvidas na regulação da proliferação celular, migração, diferenciação celular e apoptose. Sendo as vias da MAPK e PI3K / AKT (fosfoinositide 3-quinase / Protein kinase B) as mais comumente envolvidas no processo de surgimento do melanoma. Essas vias atuam de forma exacerbada nesse processo (ISOLA; EDDY; CHEN, 2016). Na via MAPK, o gene RAS está mutado em cerca de 20% dos melanomas. Essa mutação permite que a proteína permaneça ativa, assim como sua sinalização *downstream* vias ERK1 / 2. A mutação no gene BRAF é a mais comum nos casos de melanoma cutâneo, encontrada em cerca de 60% dos casos (LIU et al., 2017).

Figura 1: Progressão do melanoma. Formação do nevo benigno: proliferação controlada de melanócitos com o gene BRAF mutado para produzir um nevo benigno. Nevo displásico: Os melanócitos sofrem novas mutações como a perda da PTEN e CDKN2A iniciando uma proliferação anormal, resultando em uma lesão pré-maligna com atípica citológica aleatória. Fase de crescimento radial: os melanócitos adquirem capacidade de proliferar horizontalmente na epiderme, formando o melanoma in situ. Fase de crescimento vertical: numerosos eventos bioquímicos incluindo a perda de E-caderina e a expressão de N-caderina permitem que células malignas invadam a membrana basal e proliferem verticalmente na derme adquirindo potencial metastático. Metástase: os melanócitos malignos propagam-se para outras áreas do corpo, geralmente primeiro para os nódulos linfáticos, depois para a pele, tecidos moles subcutâneos, pulmões e cérebro.



Fonte: <http://www.pathophys.org/melanoma/>

O alto grau de mutações envolvidas nas transformações celulares que originam o melanoma promove uma menor sensibilidade aos tratamentos e sua alta taxa de metástase (BALCH et al., 2001). Durante esse processo, o microambiente desempenha um papel crucial. Este é constituído principalmente de células estromais, células imunes e pelas citocinas e demais mediadores inflamatórios secretados pelas células. O sistema imunológico, no contexto tumoral, desempenha um processo dual, já que ele atua no processo de imunovigilância, destruindo células tumorais. Contudo, as células neoplásicas conseguem romper esse processo e fazer com que o sistema imune atue em favor do tumor (FRANCO et al., 2017).

Em casos de tumores localizados, o melanoma é tratado com remoção cirúrgica e apresenta cerca de 92% de chance de cura. Já nos casos de diagnóstico tardio, o tratamento pode ser quimioterápico e com terapia direcionada envolvendo ou não radiação. Os componentes da via MAPK / ERK são os principais alvos das terapias direcionadas. Entre eles, a proteína BRAF mutada é um alvo importante (MCCUBREY et al., 2012). Entre os medicamentos que atuam nessa mutação, o vemurafenib é um inibidor conhecido e que obteve resultados interessantes,

umentando a taxa de sobrevida global em 16 meses de cerca de 50% dos pacientes tratados. Entretanto, muitos dos pacientes podem desenvolver resistência ao inibidor, devido a reativação da via MAPK ou pelo alto grau de mutação comum no melanoma (TEH; CHEN, 2012).

O desenvolvimento da resistência ao tratamento é a principal dificuldade encontrada nos pacientes tratados com monoterapia. Por esse motivo, as terapias combinadas são comumente administradas. Por exemplo, um paciente com melanoma pode realizar a cirurgia e fazer uso da imunoterapia com interferon. Já em outro paciente, o tratamento pode ser de sessões de imunoterapia em associação com quimioterapia com os derivados da platina ou radioterapia, variando de acordo com o comprometimento do tumor (ISOLA; EDDY; CHEN, 2016).

2.4 QUIMICIONAS E MELANOMA

As diversas interações entre as células tumorais e o sistema imune são processos complexos e desafiadores. Algumas moléculas que atuam nessas interações são as quimiocinas. Elas apresentam propriedades quimioatrativas que guiam a circulação de células imunes dentro do microambiente tumoral. São divididas em 4 grupos (XCL, CCL, CXCL, e CX3CL) com base na posição de dois resíduos de cisteína na sua sequência e se ligam a 19 receptores transmembranas (JACQUELOT et al., 2018). Entre os mediadores imunes, as quimiocinas desempenham um papel importante na migração celular, vigilância imune, inflamação e em diversas condições patológicas. A ação delas é mediada pela sua interação com uma subfamília de receptores acoplada a proteína G (YAM; CHTANOVA, 2019).

As quimocinas da família CC, também conhecidas como beta-quimiocinas, são responsáveis por atraírem, principalmente, monócitos, mas também podem atrair basófilos, eosinófilos e as células natural killer. Uma de suas integrantes é a quimiocina atrativa de monócito MCP-1/CCL2 que atua na resposta inflamatória. Outra integrante dessa família é a CCL5/RANTES, que participa de processos inflamatórios na homeostase tecidual. A família das CXC, também conhecida por alfa-quimiocina, apresenta como principal função a quimioatração dos monócitos. Ela tem como uma de suas integrantes a interleucina 8/CXCL8 (PALOMINO; MARTI, 2015).

Nos casos de lesões na pele, elas atuam no processo inflamatório inicial. As IL-8, CXCL1, CCL2, CCL3 e CCL5 atraem os monócitos e neutrófilos, ampliando a resposta imunológica e atuando no reparo da lesão (JACQUELOT et al., 2018). Uma desregulação na secreção dessas moléculas pode originar uma inflamação crônica, ou seja, um processo de inflamatório ativo. Atuando tanto no reparo do tecidual quanto originando novas lesões de forma simultânea, essa é uma característica importante que origina o câncer de pele (KONG,

2014). Outras moléculas envolvidas nesse processo incluem fatores de transcrição e citocinas. Elas desempenham um papel crítico no processo inicial da carcinogênese cutânea, pois controlam a ativação e transformação em melanoma metastático (MARU et al., 2014, JACQUELOT et al., 2018).

A IL8 atua no processo de reparação de lesões cutâneas e tem importância na malignidade do melanoma (UEN et al., 2015). Um estudo foi capaz de encontrar níveis séricos elevados dessa quimiocina em pacientes com melanoma metastático e uma diminuição da mesma após a imunoterapia (NEAGU; CONSTANTIN; LONGO, 2015). Outras quimiocinas encontradas elevadas no soro de pacientes com melanoma metastático foram RANTES e IP10 (BURKHOLDER et al., 2014).

Alguns receptores também estão envolvidos no processo de carcinogênese cutânea. O receptor CXCR4, expresso em tumores primários, teve sua superexpressão associada à presença de ulceração, ao aumento da espessura do tumor e maior mortalidade (LONGO-IMEDIO et al., 2005). Já o receptor CXCR3 foi identificado em células de melanoma invasivo e associado com a espessura do tumor maior que 1mm (MONTEAGUDO et al., 2007).

2.5 METÁSTASE E METÁSTASE CEREBRAL

A metástase ocorre quando as células do tumor primário se estabelecem em outro órgão. Esse processo ocorre quando as células do tumor primário se desprendem e invadem a corrente sanguínea ou vasos linfáticos dos vasos presentes no microambiente até atingirem os sítios preferenciais da neoplasia específica e se estabelecerem nos órgãos secundários. A colonização dessas células no órgão secundário envolve o surgimento de novos vasos (angiogênese) com objetivo de nutrir a metástase (COGHLIN E MURRAY, 2010).

Para o estabelecimento da metástase no órgão secundário, o tumor primário desenvolve um microambiente favorável para seu estabelecimento, ou seja, cria um nicho pré-metastático. Antes do processo de invasão ter início, as células neoplásicas enviam microRNAs característicos de proliferação, migração e fatores pró-inflamatórios, facilitando o estabelecimento da metástase (DROR *et al.*, 2016).

As interações entre as células tumorais e o microambiente são importantes não só no processo de progressão tumoral, mas também são responsáveis por direcionar a metástase. Moléculas como quimiocinas e citocinas atuam guiando as células tumorais para os órgãos secundários e favorecem o estabelecimento da metástase no determinado órgão, como é no caso do receptor CCR4, que é um determinante para a metástase cerebral de melanoma. Esses

fatores podem ser produzidos pelo tumor primário e enviado para o órgão secundário ou podem estar presentes no microambiente tumoral (KLEIN et al., 2017).

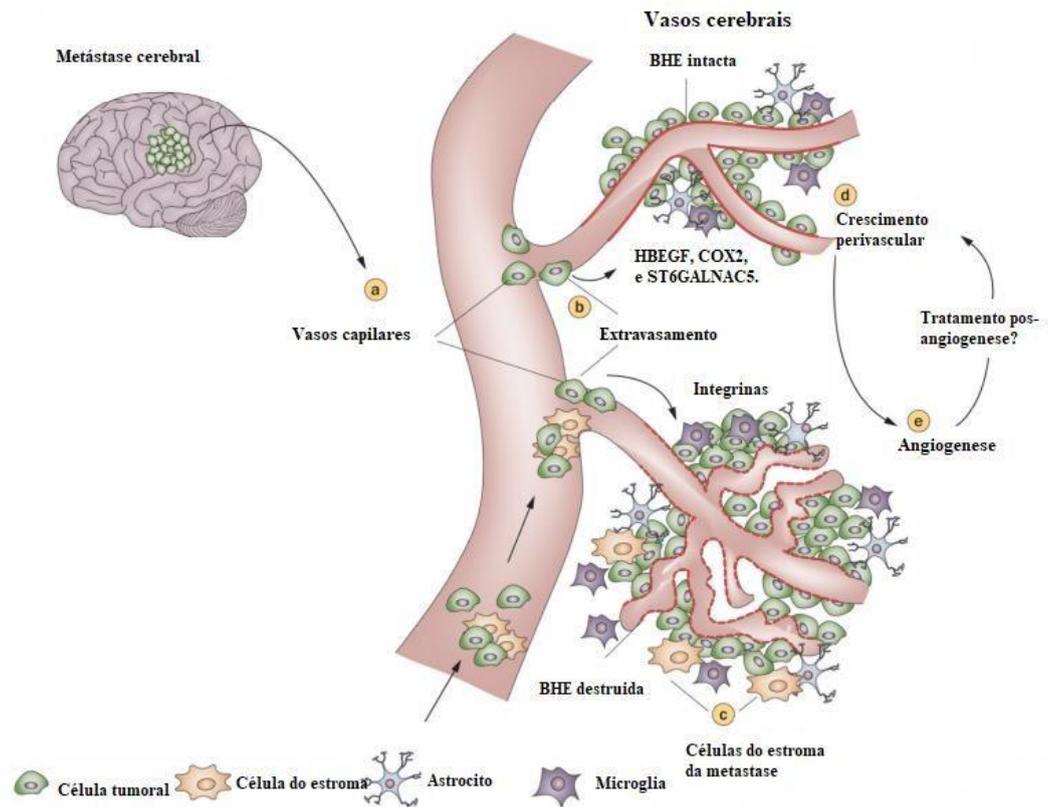
Entre as metástases, a metástase cerebral representa um prognóstico reservado, com mortalidade média menor que um ano, além de afetar a qualidade de vida e trazer prejuízos neurológicos para os pacientes (XIONG et al., 2017, KIBBI E KLUGER, 2016). A principal região que a metástase cerebral se estabelece é córtex cerebral, mas não se sabe qual o motivo dessa preferência. (DAMKY, ROSENBAUM e BOSENBERG, 2011).

As células de melanoma, para se estabelecerem no cérebro, precisam ultrapassar ou invadir a barreira hematoencefálica (BHE) e assim estabelecem as interações célula a célula com as células do estroma cerebral, como a micróglia e os astrócitos. Os mecanismos usados pelo melanoma ainda não estão bem estabelecidos, mas é conhecido que a desregulação dos astrócitos favorece a metástase cerebral. As micróglias atuam apenas em condições de estresse (KLEIN et al., 2015b), como mostra a figura 2.

Entre os processos de desregulação dos astrócitos envolvidos no processo de metástase cerebral, a produção de heparanase que facilita a passagem do melanoma pela barreira hematoencefálica é um deles. Os astrócitos também podem ser reprogramados pelas células do melanoma para produzirem citocinas pró-inflamatórias. Entre elas, a interleucina 23 IL23 apresenta capacidade de facilitar o estabelecimento da metástase cerebral (KLEIN et al., 2015b). Outra célula do sistema nervoso central que pode atuar facilitando o crescimento de cânceres cerebrais, de próstata e de pele é o neurônio. Sabe-se da importância da modulação neuronal dentro do microambiente tumoral. Contudo, pouco se conhece sobre os mecanismos usados pelos neurônios para favorecer o crescimento tumoral (CHANPIMOL et al., 2017b) .

Figura 2: Processo de formação da metástase cerebral: as células do tumor primário desderem caem na corrente sanguínea e subsequentemente extravasam através da BBB e entram no parênquima cerebral. Três genes medeiam migração trans-BHE das células de câncer: HBEGF, COX2 e ST6GALNAC5.78. Além disso, ocorre a ativação de integrinas para controlar a captura e adesão de células tumorais à vasculatura. As células tumorais metástases podem trazer suas próprias células do estroma normal em metástases. Após o extravasamento, as células tumorais crescem ao longo de vasos sanguíneos pré-existentes (crescimento perivascular) e recrutam novos vasos sanguíneos (angiogênese) para obter nutrientes suficientes para sustentar sua proliferação. Abreviação: BHE, barreira hematoencefálica.

Fonte:



10.1038/nrclinonc.2011.58

A inflamação desempenha um papel importante na metástase cerebral com algumas moléculas envolvidas nesse processo. Um estudo demonstrou que o receptor de quimiocina CCR4 é altamente expresso em melanoma metastático no cérebro em comparação com o melanoma cutâneo. Os seus ligantes são as quimiocinas CCL22 e CCL17, que são altamente expressos nos estágios iniciais da metástase cerebral, antes mesmo da interação das células do melanoma com as células do cérebro (KLEIN et al., 2017).

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS

Para a realização das culturas primárias corticais mistas foram usados ratos albinos neonatos da linhagem *Wistar*. Estes foram obtidos e criados no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, sem restrições à dieta e à água. Todas as etapas experimentais foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE CEP 23076.0125002015-09 (anexo A). Os animais eram recém-nascidos entre 0 e 3 dias de nascimento e oriundos de redução de ninhada para controle de crescimento do próprio biotério.

3.2 CULTURAS PRIMÁRIAS CORTICAIS MISTAS

Os animais foram sacrificados por decapitação. O cérebro foi isolado, a meninge removida e o córtex cerebral separado e foi então mantido em PBS-glicose (tampão fosfato com glicose 0,6%) estéril. O tecido foi dissociado em tubo falcon por pipetagem. As células em suspensão foram submetidas à centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foram adicionados meio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* com nutriente F-12, Gibco) e soro fetal bovino (SFB) a 10% (*Gibco*).

As células foram contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 24 poços, sobre lamínulas previamente tratadas com poly-l-lisina (*Sigma-Aldrich*) na quantidade de 2×10^5 células por poço, e de 7×10^5 células por garrafa de cultura de 25cm^2 . As células foram mantidas por 12-14 dias a 37°C e 5% de CO_2 , havendo troca do meio a cada dois dias.

3.3 LINHAGENS DE MELANOMA

Foram utilizadas duas linhagens de melanoma humano, a SKMEL-28 (Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ) e a UACC62 (ATCC), essa última gentilmente doada pelo Prof. Dr. Roger Chammas, do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

As linhagens de melanoma utilizadas apresentam como característica comum a mutação no gene *braf* e a capacidade de metastizar. Entretanto, as linhagens apresentam algumas diferenças como: morfologia, velocidade de proliferação e meios de cultura para manutenção e crescimento. A UACC62 é cultivada no meio *DMEM High Glicose (Dulbecco's)* também com

a suplementação do SFB a 10%, apresenta morfologia alongada e maior velocidade de proliferação com *doubling time* de 31.3 horas. Já a SKMEL-28 é cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium – Dulbecco's*) com SFB a 10%, é a que apresenta maior tamanho com uma morfologia estrelada e um *doubling time* de 35.1 horas.

3.4 CO-CULTURA DAS LINHAGENS TUMORAIS E PRIMÁRIAS MISTAS

A co-cultura foi realizada entre o 12º e o 14º dias de cultivo das células primárias mistas, quando elas apresentavam confluência e maturidade necessárias para a realização das intervenções, as células estavam em placas de 24 poços. O seu meio foi descartado, as células foram lavadas com meio sem soro e sobre elas foram adicionadas 3×10^4 células das respectivas linhagens tumorais de melanoma, SKMEL-28 e UACC62.

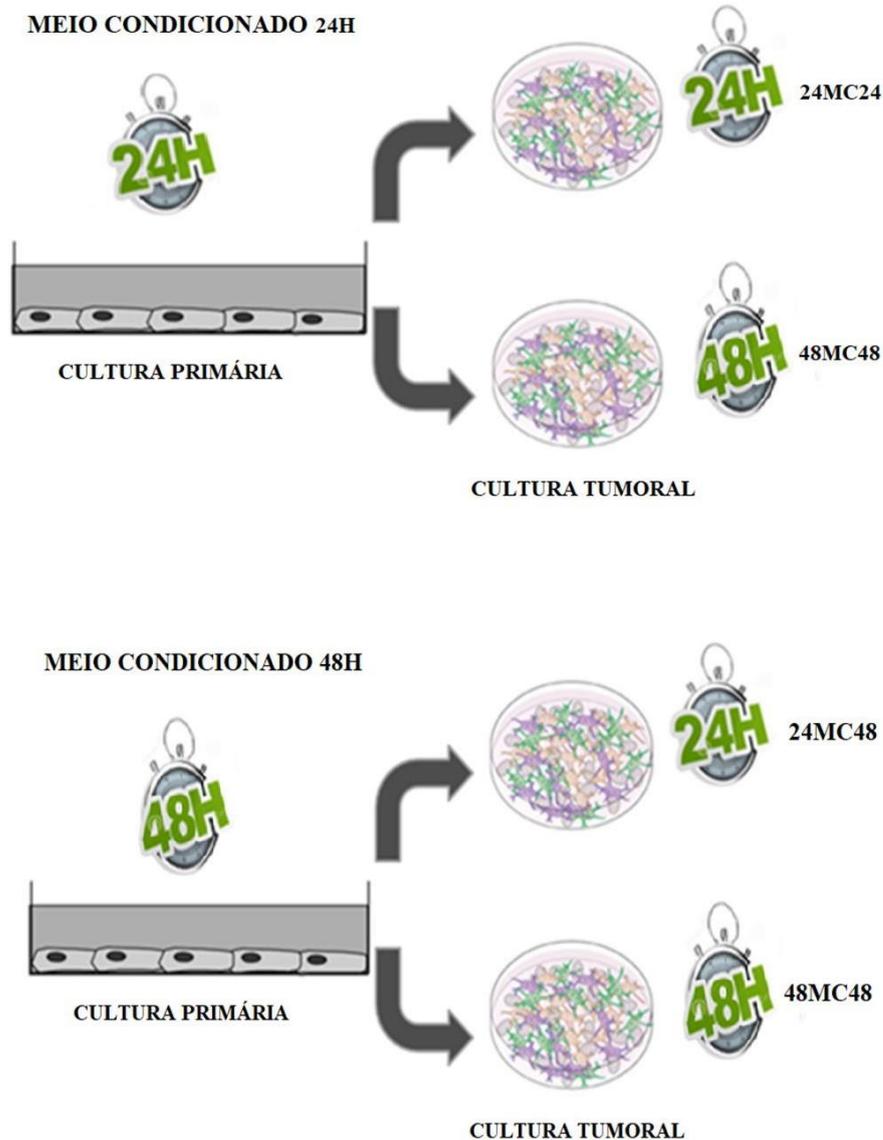
As células então foram cultivadas com *DMEM F12* suplementado com SFB a 0,5%. Após 24 e 48 horas de crescimento das co-culturas, os sobrenadantes foram coletados para posterior análise de seu conteúdo. As co-culturas sobre as lamínulas das placas de 24 poços foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência para caracterização.

3.5 ENSAIO DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS PRIMÁRIAS MISTAS SOBRE AS LINHAGENS DE MELANOMA

Quando a cultura primária cortical mista atingiu a confluência 70-80% nas garrafas de 25cm², também entre o 12º e o 14º dias de cultivo, as mesmas foram lavadas com meio sem soro e incubadas com DMEM-F12 contendo SFB a 0,5%. Havendo a partir de então a produção de um meio condicionado (MC) formado pelos fatores solúveis secretados pelas células mistas, durante 24 horas (MC24) e 48 horas (MC48).

Depois desses períodos de incubação o sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 800g por 3 minutos e filtrado. Os MCs produzidos foram colocados sobre as linhagens de melanoma SKMEL-28 e UACC62 por mais 24 horas (24MC24 e 24MC48) e 48 horas (48MC24 e 48MC48). Os sobrenadantes finais foram coletados para posterior análise de seu conteúdo. A figura 3 ilustra como o ensaio foi realizado.

Figura 3: Desenho experimental do ensaio do meio condicionado. O meio condicionado (MC) foi produzido após 24 (MC24) ou 48 horas (MC48) pelas culturas primárias mistas. O MC foi então coletado, centrifugado e filtrado para então ser incubado sobre as linhagens de melanoma, por mais 24 ou 48 horas.



Fonte: Própria autora

3.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As co-culturas, bem como as células isoladas, tanto da cultura primária mista como das linhagens de melanoma foram submetidas ao ensaio de imunofluorescência para caracterização. As células sobre as lamínulas e sem sobrenadante foram fixadas com ácido metílico e acetona

1:1 por 10 minutos a -20°C e lavadas com PBS 1x. Em seguida foi feito o bloqueio com BSA 1% (*Bovine serum albumin - Sigma Chemical Corporation, Saint Louis, EUA*) em PBS por 1 hora e incubação com anticorpo primário por 14-16 horas diluído 1:100 na solução bloqueio: *rabbit* anti-MITF 1:100 (Boster Biological Technology), *rabbit* anti-GFAP 1:100 (Imuny) e *mouse* anti- β -Tubulina-III 1:100 (Sigma-Aldrich).

As células foram submetidas a 3 lavagens com PBS e incubadas com os anticorpos secundários fluorescentes (Santa Cruz) por 1 hora a temperatura ambiente, anti-*mouse* e anti-*rabbit*, diluídos em solução bloqueio a 1:300. Os núcleos celulares foram marcados com Hoechst 33342 (*Invitrogen, Carlsbad, EUA*) por 10 minutos a temperatura ambiente, diluídos a 1:1000. Seguida a montagem das lâminas em glicerol 40% em PBS, as células foram fotografadas com a câmera digital Nikon (Nikon Canada) acoplada a um microscópio Nikon TS2-S-SM.

3.7 DOSAGEM DE QUIMIOCINA

A dosagem de quimiocinas foi realizada no sobrenadante das co-culturas e das culturas de melanoma incubadas com MC oriundo das células primárias mistas. Foi utilizado o ensaio denominado *Cytometric Bead Array (CBA)* através de um kit (BD Biosciences, Franklin Lakes-EUA) que utiliza microesferas de poliestireno magnéticas (também chamadas *beads*) conjugadas a anticorpos de alta afinidade e marcadas com fluoróforos. A partir dessa metodologia foi obtido um complexo “sanduíche” formado pelas *beads* de captura, pelo analito e pelo anticorpo de detecção conjugado à ficoeritrina (PE - *PhycoErytrin*).

A intensidade de fluorescência da PE para cada complexo “sanduíche” revela a concentração de determinada citocina na amostra testada. A fluorescência foi então detectada por citômetro de fluxo e a concentração calculada a partir da comparação com um padrão de concentração conhecida. Foram analisadas as quimiocinas CXCL10/IP-10 (limite de detecção 2,8 pg/mL), CCL2/MCP-1 (limite de detecção 2,7 pg/mL), CXCL9/MIG (limite de detecção 2,5 pg/mL), CCL5/RANTES (limite de detecção 1 pg/mL) e a CXCL8/IL-8 (limite de detecção 0,2 pg/mL). Esse Kit é específico para quimiocinas humanas. Foram realizados 4 experimentos distintos para a análise das quimiocinas.

3.8 ENSAIO DE SILENCIAMENTO

O siRNA da IP10 e o siRNA do controle (CTR) foram adquiridos na Santa Cruz *Biotechnology, INC*. As linhagens de melanoma foram cultivadas em placas de 6 poços durante

24 horas em meio sem antibiótico. Os siRNAs foram misturados ao reagente de transfecção (*Santa Cruz Biotechnology, INC*) e incubados durante 45 minutos em ambiente protegido de luz.

Utilizou-se 4µl tanto do siRNA IP10 como do CTR siRNA para adição ao meio de transfecção (*Santa Cruz Biotechnology, INC*) em cada poço, seguido de incubação por 7 horas. Foi então acrescentado aos poços meio com 2x a quantidade de antibiótico e SFB a 20%, por mais 18 horas. O conteúdo dos poços foi retirado e as células foram incubadas com as condições experimentais de MC por 24 e 48 horas. Foram repetidos 3 experimentos distintos para analisar os efeitos do silenciamento

3.9 ENSAIO DE INVASÃO POR *TRANSWELL*

Para o ensaio de migração, foram utilizadas as células silenciadas por 24 e 48 horas. Na ausência de SFB, 3×10^4 células foram colocadas na câmara superior de um enxerto (8 µm de tamanho de poro, *Costar, Corning, NY*), incubadas com o MC das culturas primárias mistas. As células que migraram após 24 e 48 horas de exposição, foram coradas com cristal violeta a 0,1%, fotografadas e contadas usando uma câmera digital *Nikon (Nikon Canada)* acoplada a um microscópio *Nikon TS2-S-SM*. O número de células migradas por campo foi contando em pelo menos três campos aleatórios de cada condição e os ensaios foram repetidos 3 vezes.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados quantitativos foram representados como a média \pm desvio padrão ($n = 3$). Foi realizado o teste de D'Agostino para avaliação de normalidade da amostra. Como os resultados seguem a normalidade foram utilizados o teste *t de Student* e os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPadPrism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA)*

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DA CULTURA MISTA E LINHAGENS TUMORAIS

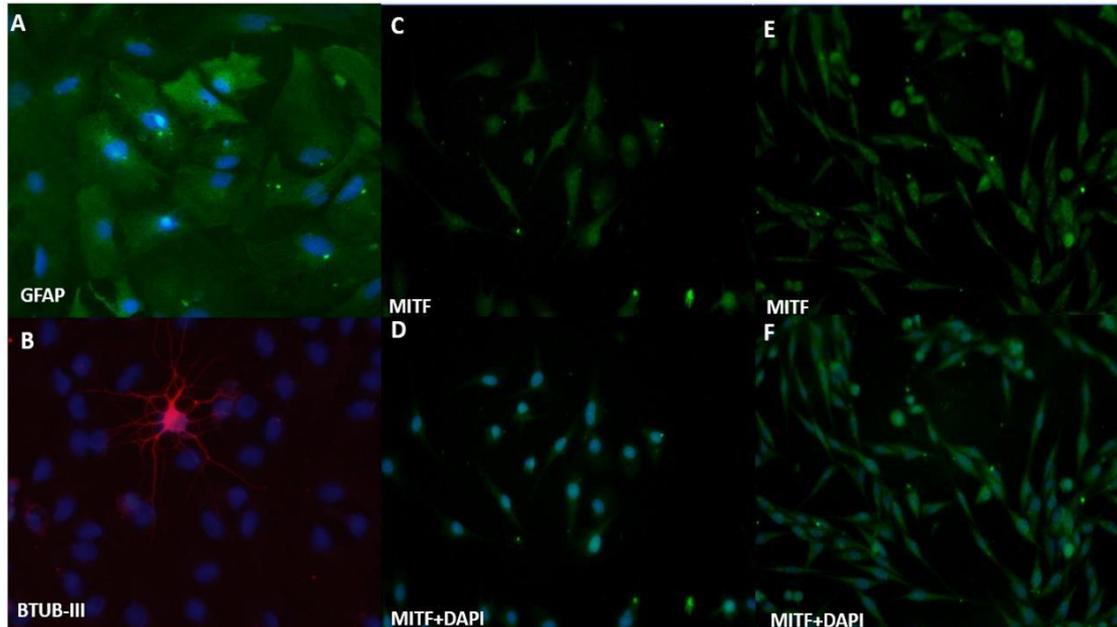
Para o estabelecimento do modelo *in vitro* da cultura primária, os experimentos de co-cultura e MC foram feitos com SFB a 0,5% para que os fatores de crescimento e nutrientes presentes no soro não interferissem na interação entre as células frente aos efeitos dos fatores solúveis. Não foram observadas alterações morfológicas nem de viabilidade celular devido à presença do soro nessa concentração baixa por 24 ou 48 horas (dados não demonstrados).

A realização da co-cultura teve como objetivo mimetizar a metástase cerebral e compreender como ocorrem as interações celulares entre as células tumorais e a cultura primária. Também não foram observadas alterações morfológicas das células no co-cultivo, comparado com as células isoladas. Ademais, foi possível observar que a proliferação das linhagens tumorais não sofreu alterações, indicando que a co-cultura foi bem estabelecida, nas 24 e 48 horas.

Após a avaliação morfológica foi realizada a validação imunofenotípica do modelo. A figura 4 mostra a caracterização das células em culturas isoladas. A presença de astrócitos foi confirmada pela marcação com GFAP (proteína do citoesqueleto dos astrócitos) (Figura 4A). Na figura 4B observa-se um neurônio em cultura primária mista com o citoesqueleto marcado com β -Tubulina III na cor vermelha.

Em seguida, foi feita a caracterização das linhagens de melanoma. Nas figuras 4C e 4D, as células da linhagem SKMEL-28 foram marcadas com MITF, fator de transcrição que identifica as células de melanoma. A mesma proteína foi utilizada para a caracterização imunofenotípica da linhagem UACC62 (Fig 4E e 4F).

Figura 4: Cultura primária cerebral cortical mista e linhagens de melanoma. Aumento de 200x. (a) Astrócitos indicados com GFAP. (b) Neurônios marcados com β -TUB III. (c) SKMEL-28 marcada com MITF. (d) SKMEL-28 marcada com MITF e DAPI. (e) UACC62 marcada com MITF. (f) UACC62 marcada com MITF e DAPI.



4.2 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CO-CULTURAS

Na figura 5 pode-se visualizar as co-culturas da SKMEL-28 e da UACC62 sobre a cultura primária mista, sendo possível observar a marcação dos astrócitos com o GFAP e das distintas linhagens de melanoma junto com os neurônios, identificados com a β -Tubulina III.

Ademais, outro ensaio foi realizado para avaliar o efeito do MC produzido pelas células da cultura cerebral mista sobre as células de melanoma. Foi utilizado o meio com fatores secretados pela cultura primária mista durante 24h e durante 48h. Foi possível observar independentemente dos diferentes tempos de MC, que não houve alterações na expressão dos marcadores de caracterização: MITF e β -TUB III. A Figura 6 representa essas marcações na condição 48MC24; em todas as outras condições, foi observado o mesmo padrão (dados não mostrados).

Figura 5: Co-cultura das linhagens de melanoma sobre a cultura primária mista. (A-C) co-cultura da SKMEL-28 na cultura mista. (D-F) co-cultura da UACC62 na cultura mista. GFAP em verde, B-Tub em vermelho. Nas figuras astrócitos são indicados pela seta laranja, os neurônios pela seta branca e as linhagens neoplásicas pela seta amarela. Aumento de 200x.(CP-cultura primária mista)

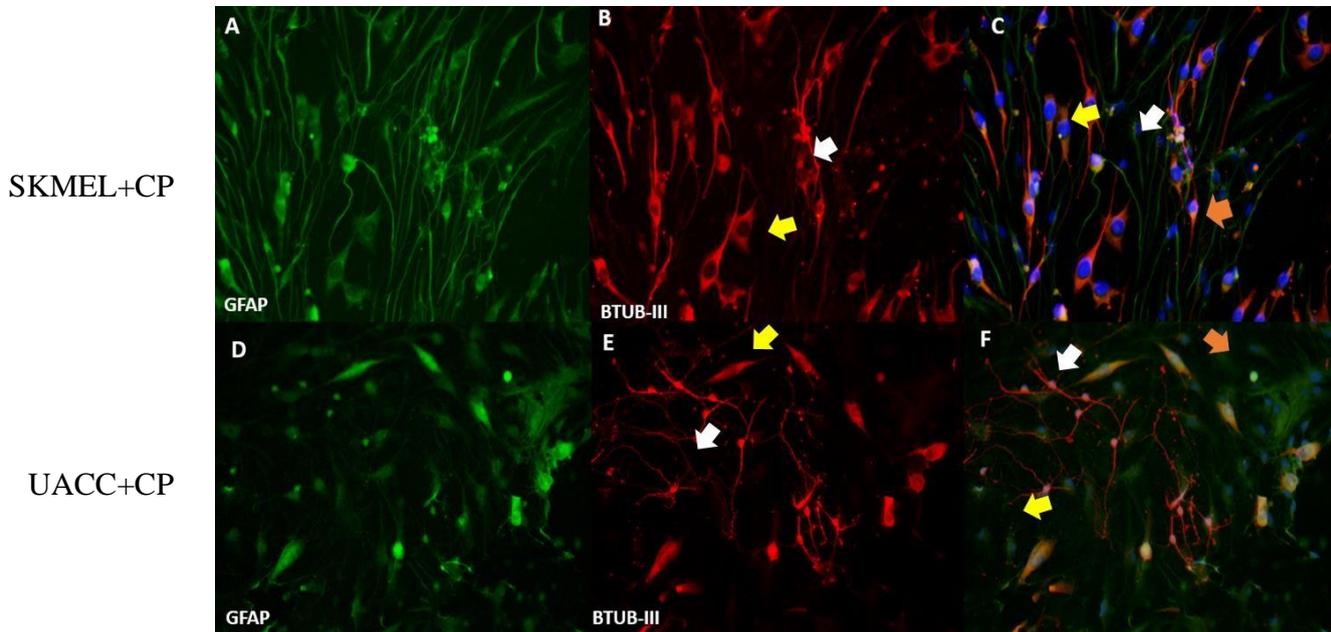
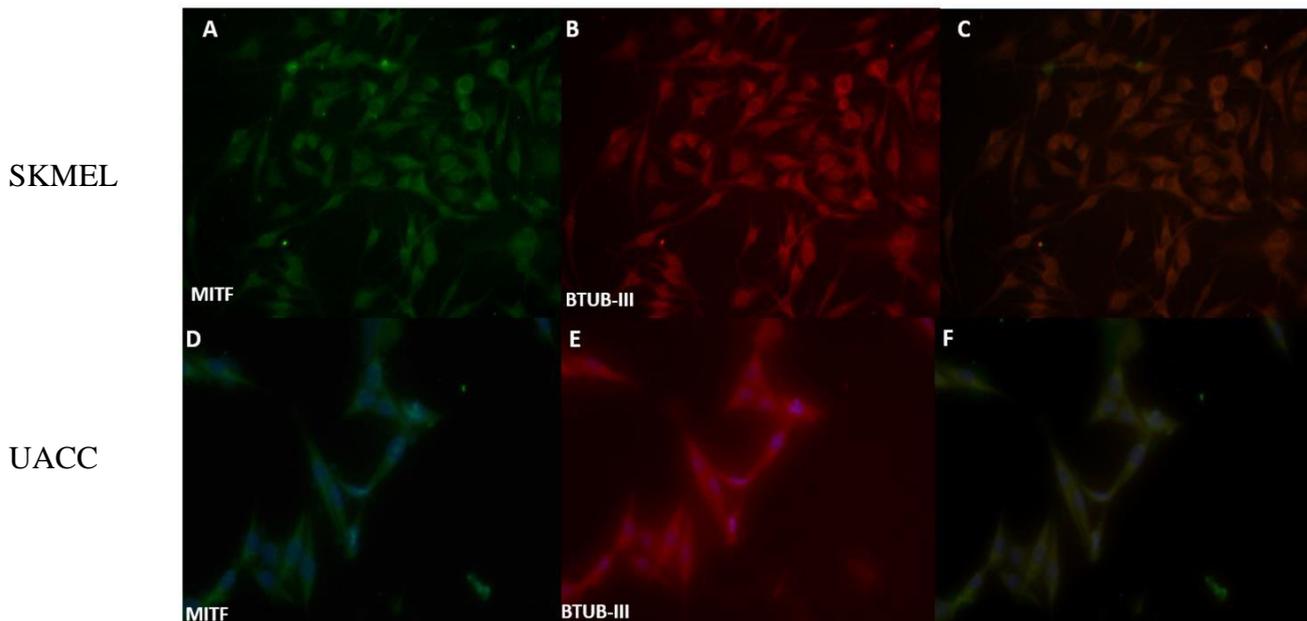


Figura 6: Linhagens de melanoma com meio condicionado de células da cultura mista. (A) SKMEL-28 incubada com MC da cultura primária mista, marcada com MITF, (B) SKMEL-28 incubada com MC da cultura primária mista marcada com B-tubulina III, (C) Merge da SKMEL-28 incubada com MC da cultura primária mista, (D) UACC62 incubada com MC da cultura primária mista marcada com MITF, (E) UACC62 incubada com MC da cultura primária mista marcada com B-tubulina III, (F) Merge da UACC62 incubada com MC da cultura primária mista. Aumento de 200x.



4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS QUIMIOCINAS PRODUZIDAS NO MODELO *IN VITRO* DE METÁSTASE CEREBRAL

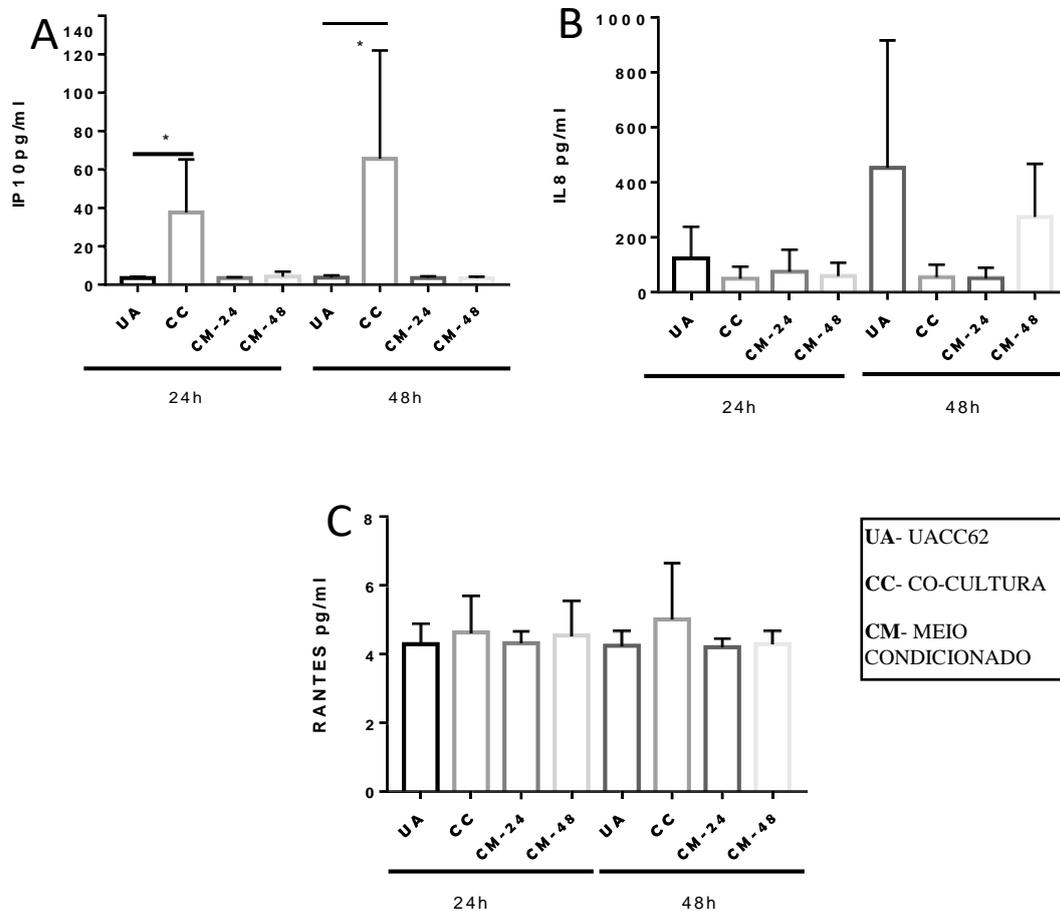
Com o objetivo de compreender a participação do microambiente tumoral no estabelecimento da metástase, foi caracterizada a secreção de quimiocinas pelo modelo. As quimiocinas CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, CCL5/RANTES e a CXCL8/IL-8 foram dosadas nas seguintes condições experimentais: 1) quimiocinas produzidas pela linhagem UACC62 24h, 2) quimiocinas produzidas pela linhagem de UACC62 48h, 3) quimiocinas produzidas pela linhagem co-cultura (cultura cortical mista e linhagem UACC62) 24h, 4) quimiocinas produzidas pela linhagem co-cultura (cultura cortical mista e linhagem UACC62) 48h. As mesmas condições foram utilizadas na SKMEL-28.

Também foi avaliada a produção das quimiocinas pelas células de melanoma cultivadas no MC proveniente da cultura cerebral mista nos tempos de 24 e 48 horas. Nas seguintes condições: 5) quimiocinas produzidas pela UACC62 em resposta ao MC24 (24MC24), 6) quimiocinas produzidas pela UACC62 em resposta ao MC24 (48MC24), 7) quimiocinas produzidas pela UACC62 em resposta ao MC48 (24MC48), 8) quimiocinas produzidas pela UACC62 em resposta ao MC48 (48MC48). As mesmas condições foram utilizadas na SKMEL-28.

Quando o modelo de metástase *in vitro* foi estabelecido com UACC62, foi possível detectar a secreção das IP10/CXCL10, RANTES/CCL5 e IL8/CXCL8. As quimiocinas MIG e MCP-1/CCL2 tiveram valores menores que os limites de detecção. Na figura 7A, a secreção da IP10 pela UACC62 foi significativamente maior na condição de co-cultivo no tempo de 24h (mediana=29,46 pg/ml) quando comparado com a UACC62 sozinha (mediana = 3,35 pg/ml), ($p=0,02$). O mesmo ocorreu no tempo de 48h ($p=0,02$)

Na figura 7B a quimiocina IL8 foi reduzida quando a UACC62 estava na condição de co-cultura (mediana=48,01 pg/ml) quando comparada com UACC62 sozinha (mediana= 117,2 pg/ml). A redução da IL8 também foi observada nas condições de MC quando comparado com a UACC62 sozinha, exceto na condição de 48MC48 contudo, não foi significativa. A figura 7C mostra que a secreção da quimiocina RANTES foi baixa em todas as condições do estudo.

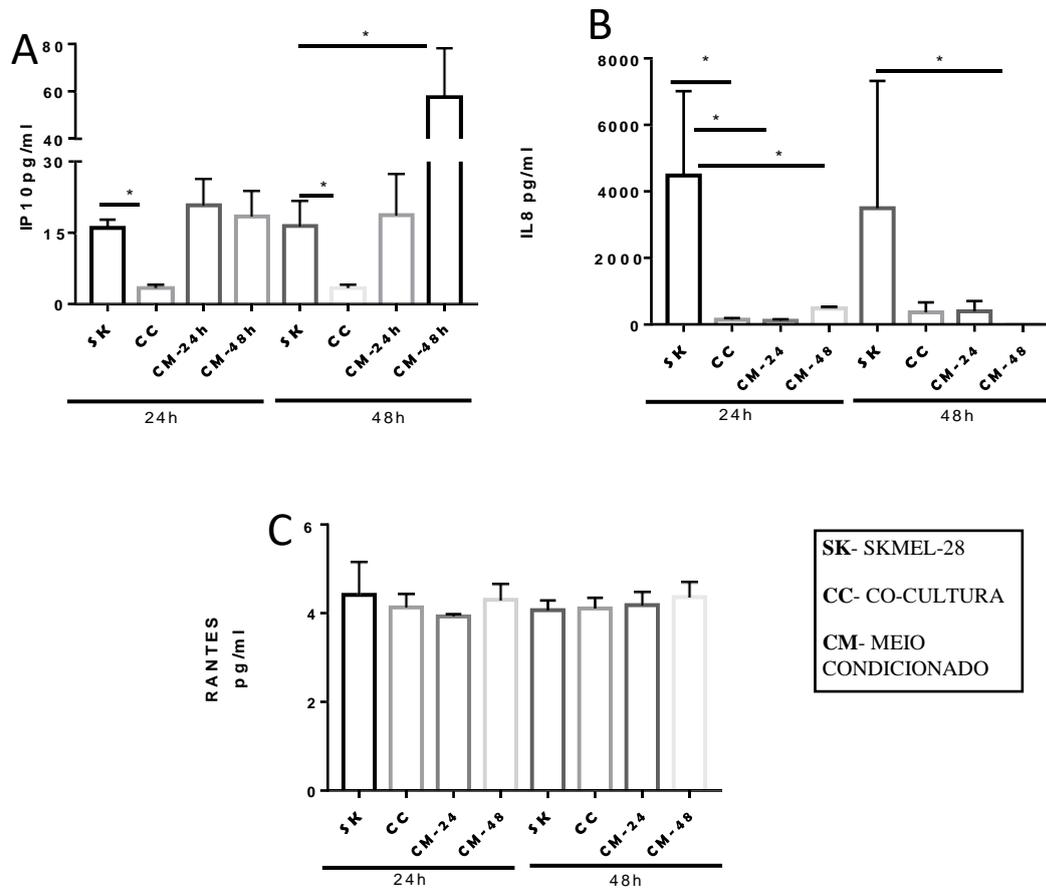
Figura 7: Caracterização dos níveis de quimiocinas pela linhagem UACC62. A) secreção da quimiocina IP10, B) secreção quimiocina RANTES.



No modelo com SKMEL-28 os valores de IP10 foram significativamente inibidos na co-cultura 24h (mediana=3,25 pg/ml) ($p=0,0286$) quando comparado com a SKMEL-28 sozinha (mediana=15,76pg/ml). O mesmo ocorreu no tempo de 48h, com valor de $p=0,028$ (Figura 8A). Os valores de IP10 foram significativamente elevados quando a célula tumoral foi colocada em contato com o MC tardio (MC48) da cultura primária mista (mediana=58.7 pg/ml), quando comparado com a SKMEL-28 sozinha ($p= 0,0286$).

A figura 8B representa a análise da secreção da quimiocina IL8 pela SKMEL-28. É possível observar níveis reduzidos dessa quimiocina quando colocada em contato direto no tempo de 24h (mediana=135.4 em pg/ml) com $p=0,02$ pg/ml. e no contato indireto inicial (MC24) ($p=0,02$ pg/ml). No tempo de 48h o perfil se repetiu, contudo foi significativo apenas no MC de 48h ($p=0,0286$ pg/ml). A figura 8C mostra a secreção da quimiocina RANTES que é pouco secretada tanto pela SKMEL-28 em si quanto no modelo, além de variar pouco nas diferentes condições.

Figura 8: Caracterização dos níveis de quimiocinas pela linhagem SKMEL-28. A) secreção da quimiocina IP10, B) secreção quimiocina IL8, C) secreção da quimiocina RANTES.

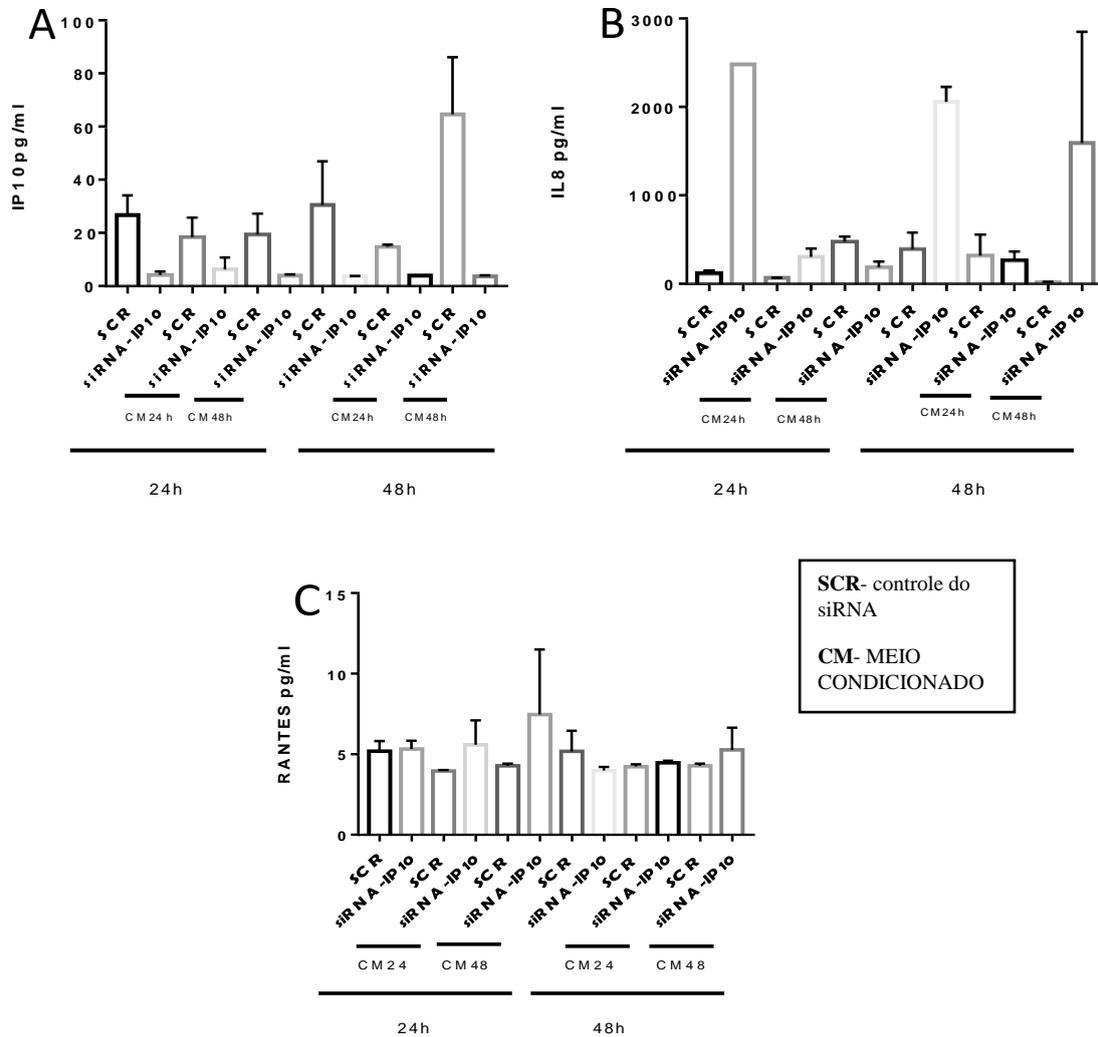


4.4 SILENCIAMENTO DA QUIMIOCINA MAIS DIFERENCIALMENTE EXPRESSA NAS CONDIÇÕES DE MEIO CONDICIONADO (MC)

A quimiocina IP10 foi secretada de forma distinta nas condições de MC pela linhagem SKMEL-28, por esse motivo, foi realizado seu silenciamento e posterior redosagem da secreção de quimiocinas. A SKMEL-28 mostrou valores aumentados da quimiocina IP10 nas condições controle (27,01 pg/ml) e valores menores quando a quimiocina foi silenciada (3,05 pg/ml), corroborando que o silenciamento foi eficaz, inclusive quando colocada em contato com o MC da cultura primária mista (Figura 9 A).

Já a IL8 foi aumentada depois do silenciamento da P10, tanto no tempo de 24h (105,2 pg/ml) quanto no de 48h (2804 pg/ml), aumentando também na condição de MC 48MC48 (1508 pg/ml) (Figura 9B). A figura 9C mostra a secreção da quimiocina RANTES, ainda pouco secretada, independentemente do silenciamento.

Figura 9: Secreção de quimiocina pela linhagem SKMEL-28 silenciada. A) secreção da quimiocina IP10, B) secreção quimiocina IL8, C) secreção da quimiocina RANTES.



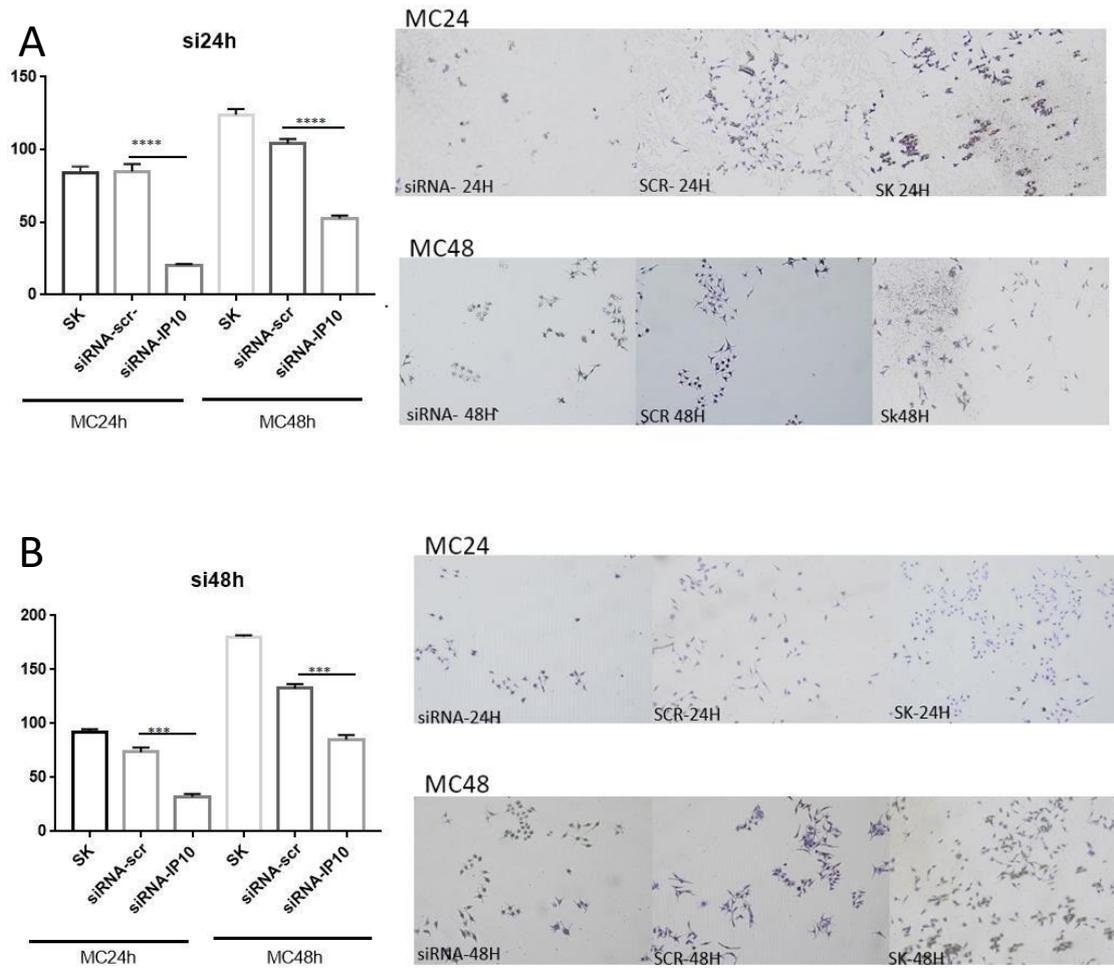
4.5 CONSEQUÊNCIAS FUNCIONAIS DO SILENCIAMENTO DA IP10 NAS CONDIÇÕES DE MC

Para entender como a quimiocina IP10 encontra-se envolvida no processo de invasão da linhagem SKMEL-28, foi realizado o ensaio de *transwell*. Foram utilizados os MCs da cultura primária nos tempos de 24h e 48h como meio atrativo para as células de melanoma.

Na figura 10, apresentamos os gráficos do ensaio de *transwell*, com a SKMEL-28 submetida aos MCs inicial e tardio da cultura mista. Na figura 10A representa o silenciamento de 24h em contato com os meios de 24h e 48h. Dessa forma, foi observado que tanto no tempo de 24h quanto no de 48h há diminuição significativa da invasão celular ($p=0,01$ e $p=0,013$, respectivamente). Já na figura 10B, no silenciamento de 48h ocorreu a diminuição da migração

nas condições de MC24 e MC48. Contudo, essa diminuição é mais visível no MC inicial ($p=0,01$, $p=0,015$ respectivamente).

Figura 10: Invasão das células da linhagem SKMEL-28 em contato com o meio condicionado da cultura primária mista. A) silenciamento de 24h, B) silenciamento de 48h.



5 DISCUSSÃO

A realização da co-cultura teve o objetivo de analisar a interação célula a célula, entre as células tumorais e as células primárias mistas (astrócitos, neurônios). Dessa forma, os resultados da co-cultura mostram que a SKMEL-28 e a UACC62 se estabelecem bem sobre a monocamada da cultura primária sem causar danos morfológicos na mesma. Nesse modelo estudou-se as interações entre os astrócitos, neurônios e células tumorais. Diferente dos modelos usados comumente, apenas com astrócitos e células tumorais.

Como o estudo desenvolvido por Barros et al (2014) analisou as interações entre células de câncer de próstata e os astrócitos isolados. Sendo assim foram estudadas duas diferentes linhagens e apenas a mais agressiva foi capaz de estabelecer o co-cultivo sobre a monocamada astrocitária. Sabe-se que os astrócitos têm uma participação essencial no estabelecimento da metástase cerebral (KLEIN et al., 2017). As outras células que constituem o sistema nervoso central participam do microambiente tumoral, contudo ainda são pouco estudadas (ZANG, 2015, CHEN et al., 2017). Por esse motivo o modelo utiliza nesse trabalho as células que constituem o córtex cerebral.

As linhagens de melanoma utilizadas no presente estudo expressaram β -tubulina III um marcador neuronal. É explicada pela literatura, foi demonstrada a expressão da β -tubulina III em tumores de pulmão (35-80%), melanomas malignos (77%) e tumores cerebrais (85-100%) (PERSON et al., 2017).

Posteriormente à caracterização do modelo, foi analisado o perfil de quimiocinas secretadas pelas linhagens de melanoma em resposta às interações celulares do modelo. Foi realizado imunoensaio CBA (*Cytometric Bead Array*) por ser um kit que utiliza apenas anticorpos com especificidade para epítopos de quimiocinas humanas. Por esse motivo, só foi possível determinar a secreção das quimiocinas secretadas pelo melanoma, porque as linhagens utilizadas eram humanas.

No presente trabalho observou-se valores de secreção basal elevados de IL8 nas duas linhagens de melanoma. Esta quimiocina é um regulador essencial do crescimento tumoral, invasão, migração, vascularização, ativação das metaloproteinases da matriz, especialmente através do CXCR2. Ademais esta quimiocina está relacionada ao mau prognóstico e resistência terapêutica (SOOTICHOTE et al., 2018). Contudo, nossos resultados mostram que o contato direto ou indireto das duas linhagens de melanoma com a cultura primária mista gerou uma

6 CONCLUSÃO

- **Caracterizar a expressão de quimiocinas em um modelo in vitro de metástase cerebral**

No modelo utilizado para o estudo não foi possível avaliar a secreção das quimiocinas MCP-1 e MIG. Dessa forma o modelo não é viável para estudar essas quimiocinas. Contudo, se mostrou um modelo interessante no estudo das quimiocinas IL8 e IP10. Observou-se que a IL8 tinha sua secreção inibida pelas diferentes linhagens quando estas interagem com a cultura primária.

- **Identificar a quimiocina mais diferencialmente expressa no modelo**

A elevação da IP10 se comportou de forma distinta nas diferentes linhagens. Ela foi mais secretada pela UACC62 na condição de co-cultura. Enquanto que na SKMEL-28 a mesma teve sua secreção aumentada nas condições de interação indireta (MC) com a cultura primária.

- **Avaliar as consequências funcionais do silenciamento da quimiocina mais diferencialmente expressa no modelo de metástase in vitro**

O silenciamento da IP10 demonstrou ser um fator importante, uma vez que reduziu a invasão das células da SKMEL-28. Ainda não se sabe como a IP10 interfere nesse processo. Para entender como ela interfere nesse processo são necessários novos estudos.

REFERENCIAS

- ANDRZEJ T. SLOMINSKI, ANNA A BROZYNA, CEZARY SKOBOWIAT, MICHAL A. ZMIJEWSKI, TAE-KANG KIM, ZORICA JANJETOVIC, ALLEN S. OAK, WOJCIECH JOZWICKI, ANTON M. JETTEN, REBECCA S. MASON, CRAIG ELMETS, WE LI, ROBERT M. HOFFMAN, R. C. T.; PII: On the role of classical and novel forms of vitamin D in melanoma progression and management. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, 2017.
- BARROS, E. G. DE O. et al. The reciprocal interactions between astrocytes and prostate cancer cells represent an early event associated with brain metastasis. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 31, p. 461–474, 2014.
- BURKHOLDER, B. et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 2, p. 182–201, 2014.
- CHANPIMOL, S. et al. HHS Public Access. v. 3, n. 2, p. 89–112, 2017b.
- CHEN, D. et al. MiR-15a-5p negatively regulates cell survival and metastasis by targeting CXCL10 in chronic myeloid leukemia. v. 9, n. 9, p. 4308–4316, 2017.
- CHUNG, B. et al. Human brain metastatic stroma attracts breast cancer cells via chemokines CXCL16 and CXCL12. **npj Breast Cancer**, v. 3, n. 1, p. 6, 2017.
- CICHOREK, M. et al. Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013.
- COGHLIN, C.; MURRAY, G. I. Current and emerging concepts in tumour metastasis. **Journal of Pathology**, v. 222, p. 1–15, 2010.
- DAMSKY, W. E.; ROSENBAUM, L. E.; BOSENBERG, M. Decoding melanoma metastasis. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 126–163, 2011.
- DE OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255–265, 2011.
- DROR, S. et al. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation. **Nature Cell Biology**, v. 1, n. July 2015, 2016.
- ELSHOLZ, F. et al. Calcium - A central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. **European Journal of Dermatology**, v. 24, n. 6, p. 650–661, 2014.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.
- FRANCO, S. DI et al. Role of Type I and II interferons in colorectal cancer and melanoma. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, 2017.
- FUKUNAGA-KALABIS, M. et al. UV-induces Wnt7a in the human skin microenvironment specifies the fate of neural crest-like cells via supression of Notch. **Journal of Investigative**

Dermatology, v. 135, n. 6, p. 1521–1532, 2015.

GABELLINI, C. et al. Interleukin 8 mediates bcl-xL-induced enhancement of human melanoma cell dissemination and angiogenesis in a zebrafish xenograft model. **International Journal of Cancer**, v. 12, n. 10, p. 3218–3221, 26 set. 2017.

HATANO, T. et al. C-X-C Motif Ligand 1 (CXCL1) from melanoma cells down- regulates the invasion of their metastatic melanoma cells. v. 9, n. 57, p. 31090–31097, 2018.

INGRAFFEA, A. Melanoma. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 33–42, 2013.

ISOLA, A. L.; EDDY, K.; CHEN, S. Biology , Therapy and Implications of Tumor Exosomes in the Progression of Melanoma. p. 1–18, 2016.

JACQUELOT, N. et al. Targeting Chemokines and Chemokine Receptors in Melanoma and Other Cancers. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. October, p. 2480, 2018.

KIBBI, N.; KLUGER, H. The Treatment of Melanoma Brain Metastases. **Current Oncology Reports**, 2016.

KLEIN, A. et al. Astrocytes facilitate melanoma brain metastasis via secretion of IL-23. **Journal of Pathology**, v. 236, n. 1, p. 116–127, 2015b.

KLEIN, A. et al. CCR4 is a determinant of melanoma brain metastasis. v. 8, n. 19, p. 31079–31091, 2017.

KONG, B. **Inflammation and Cancer**. Basel: Springer Basel, 2014. v. 816

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma : From pathogenesis to therapy (Review). p. 1071–1080, 2018.

LIU, Q. et al. Targeted Drug Delivery to Melanoma. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2017.

LOK, E. et al. Melanoma brain metastasis globally reconfigures chemokine and cytokine profiles in patient cerebrospinal fluid. **Melanoma Research**, v. 24, n. 2, p. 120–130, 2014.

LONGO-IMEDIO, M. I. et al. Clinical significance of CXCR3 and CXCR4 expression in primary melanoma. **International Journal of Cancer**, v. 117, n. 5, p. 861–865, 2005.

MARU, G. B.; GANDHI, K.; RAMCHANDANI, A. **The Role of Inflammation in Skin Cancer**. [s.l.] Inflammation and Cancer, Advances in Experimental Medicine and Biology, 2014.

MCCUBREY, J. A. et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Cascade Inhibitors: How Mutations Can Result in Therapy Resistance and How to Overcome Resistance. **Oncotarget**, v. 33, n. 10, p. 1068–1111, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR

GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

MONTEAGUDO, C. et al. CXCR3 chemokine receptor immunoreactivity in primary cutaneous malignant melanoma: correlation with clinicopathological prognostic factors. **Journal of clinical pathology**, v. 60, n. 6, p. 596–599, 2007.

NEAGU, M.; CONSTANTIN, C.; LONGO, C. Chemokines in the melanoma metastasis biomarkers portrait. **Journal of immunoassay & immunochemistry**, v. 36, n. 6, p. 559–66, 2015.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PELLEGRINO, A. et al. CXCR3-binding chemokines in multiple myeloma. v. 207, p. 221–227, 2004.

PERSON, F. et al. Prevalence of β III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. 2017.

SANMAMED, M. F. et al. Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 22, p. 5697–5707, 2014.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SOOTICHOTE, R. et al. Compound A attenuates toll-like receptor 4-mediated paclitaxel resistance in breast cancer and melanoma through suppression of IL-8. p. 1–12, 2018.

TEH, J. L. F.; CHEN, S. Glutamatergic signaling in cellular transformation. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 3, p. 331–342, maio 2012.

UEN, W. C. et al. Anchorage independency promoted tumor malignancy of melanoma cells under reattachment through elevated interleukin-8 and CXC chemokine receptor 1 expression. **Melanoma Research**, v. 25, n. 1, p. 35–46, 2015.

XIONG, Y. et al. MiR-29a Inhibits Growth and Metastasis of Melanoma A375 Cells by Directly Targeting Bmi1. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, n. 27, 2017.

WANG, J. X.; FUKUNAGA-KALABIS, M.; HERLYN, M. Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 3, p. 191–196, 2016.

YAM, A. O.; CHTANOVA, T. The Ins and Outs of Chemokine-Mediated Immune Cell Trafficking in Skin Cancer. v. 10, n. March, p. 1–8, 2019.

ZHANG, L. et al. Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth. **Nature**, v. 527, n. 7576, p. 100–104, 2015.

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *Steroids* (2017)

Steroids 127 (2017) 24–30



Contents lists available at ScienceDirect

Steroids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids



Corticosteroid inhibits chemokines production in systemic sclerosis patients

Andréa Tavares Dantas^{a,b,c}, Anderson Rodrigues de Almeida^b,
 Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio^b, Marina Ferraz Cordeiro^b,
 Laurindo Ferreira da Rocha Jr.^{a,b}, Priscilla Stela Santana de Oliveira^b, Michelly Cristiny Pereira^b,
 Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego^b, Claudia Diniz Lopes Marques^a, Ivan da Rocha Pitta^c,
 Angela Luzia Branco Pinto Duarte^a, Maira Galdino da Rocha Pitta^b

^a Department of Rheumatology, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil
^b Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil
^c Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Systemic sclerosis
 Glucocorticoid
 Cytokines
 Chemokines
 Immunomodulation

Chemical compound studied in this article:
 Methylprednisolone (PubChem CID: 6741)

ABSTRACT

In this study, we evaluated glucocorticoids (GC) effects on cytokine/chemokine levels in serum samples and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) production from systemic sclerosis (SSc) patients. We evaluated cytokine and chemokine levels in serum samples from SSc patients taking or not taking systemic glucocorticoids. PBMCs response to methylprednisolone (MP) was examined from 15 SSc patients and 8 healthy control subjects following PBMC stimulation with anti-CD3/CD28. Cytokine (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IL-17A) and chemokine (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIP1, CCL2/MCP-1, and CXCL10/IP-10) levels were quantified in serum and in PBMC culture supernatants by CBA or ELISA. Compared with patients not taking corticosteroids, we did not observe any significant differences in cytokines/chemokines serum levels in patients using systemic corticosteroids. After stimulation with anti-CD3/CD28, PBMCs treated with MP (100 μ M), showed a significant reduction of CCL2/MCP-1 ($p = 0.001$), CCL5/RANTES ($p = 0.04$), and CXCL8/IL-8 ($p = 0.003$) levels in SSc patients. In PBMC from healthy controls, we observed decreased IFN- γ , TNF, IL-2, and IL-10 levels after MP treatment, compared with stimulated condition ($p < 0.01$ for all). However in SSc patients, we did not find any significant reduction in these cytokine levels after MP treatment. In conclusion, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, and CXCL8/IL-8 are chemokines that are potentially modulated by corticosteroids *in vitro* in SSc patients, but no effect was observed on IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, and IFN- γ secretion. These results suggest a potential effect of GCs on SSc treatment and may reflect the benefit of their use in some patients.

1. Introduction

Several studies indicate that systemic sclerosis (SSc) presents de-regulated production of cytokines implicated in vascular damage and fibrosis. Since it has been known that Th1 cytokines, such as interferon- γ in SSc pathogenesis are not fully elucidated [3]. Chemokines are also involved in SSc development. In addition to their function as chemoattractants of T cells and inflammatory cells into tissues, they play a role in angiogenesis and fibrosis regulation. Some studies demonstrated, enhanced the expression of CCL2/MCP-1, CXCL8/IL-8, CXCL9/

APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *Immunology Letters* (2018)

Immunology Letters xxx (2018) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com



Different profile of cytokine production in patients with systemic sclerosis and association with clinical manifestations

Andréa Tavares Dantas^{a, b, *}, Anderson Rodrigues de Almeida^b, Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio^b, Marina Ferraz Cordeiro^b, Priscilla Stela Santana de Oliveira^b, Henrique de Ataíde Mariz^a, Michelly Cristiny Pereira^b, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego^b, Ivan da Rocha Pitta^c, Angela Luzia Branco Pinto Duarte^a, Maira Galdino da Rocha Pitta^b

^a Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-901, Brazil

^b Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50670-901, Brazil

^c Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50670-901, Brazil

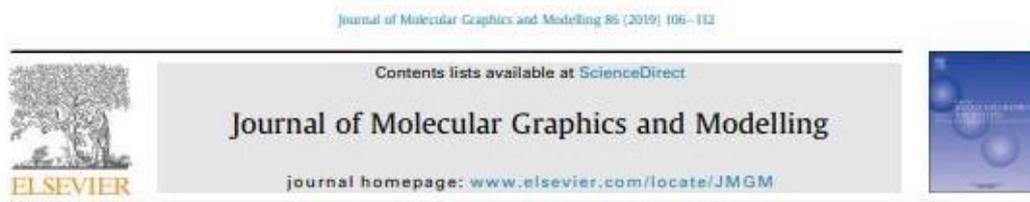
ARTICLE INFO

Keywords:
Systemic sclerosis
Cytokine
Serum
Peripheral blood mononuclear cell

ABSTRACT

Immune dysregulation is a central process in the pathogenesis of systemic sclerosis (SSc). Cytokines produced by lymphocytes and monocytes are important mediators and induce tissue damage, recruit additional inflammatory cells, and promote extracellular matrix production and fibrosis. In the present research, we aimed to study the associations between levels of cytokines in serum and culture supernatants from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and clinical manifestations in SSc patients. Serum samples were obtained from 56 SSc patients and 56 unrelated age- and gender-matched healthy individuals. Resting and anti-CD3/CD28-stimulated PBMC cultures were obtained from 19 SSc patients and 8 healthy controls. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, and IFN- γ levels were measured by ELISA or CBA. Serum cytokines, except IL-17A, were below the kit detection limit in most of the patients and controls. In unstimulated PBMC, the production of TNF ($p = 0.004$), IL-10 ($p = .048$), IL-2 ($p < 0.001$), and IL-6 ($p = 0.01$) was higher in SSc patients than in healthy controls. After anti-CD3/CD28 stimulation, scleroderma PBMCs had lower concentrations of TNF ($p = 0.009$), IL-10 ($p = .018$), and IL-2 ($p = .002$) than HC. In unstimulated PBMC, IL-2 concentration was higher in patients with esophageal dysmotility ($p = 0.04$), and IL-10 levels had a positive correlation with modified Rodnan score ($p = 0.03$). After anti-CD3/CD28 stimulation, higher levels of IL-2 and IL-4 were observed in SSc patients with lung fibrosis ($p = 0.01$ and 0.006 , respectively), and higher levels of IL-10 ($p = 0.04$) and IL-4 ($p = 0.04$) in patients with digital ulcers. In conclusion, SSc patients have a different profile of cytokine production and this was associated with clinical manifestations.

APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *Journal of Molecular Graphics and Modelling* (2019)



In vitro and *in silico* studies of antioxidant activity of 2-thiazolylhydrazone derivatives

Vinícius Gonçalves Maltarollo ^{a,1}, Marina Ferrara de Resende ^{b,1}, Thales Kronenberger ^c, Cleudiomar Inácio Lino ^a, Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio ^d, Maira Galdino da Rocha Pitta ^d, Moacyr Jesus Barreto de Melo Régo ^d, Renata Adriana Labanca ^b, Renata Barbosa de Oliveira ^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Products, Pharmacy Faculty, Federal University of Minas Gerais, 6627 Antônio Carlos AVE, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Foods, Pharmacy Faculty, Federal University of Minas Gerais, 6627 Antônio Carlos AVE, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Department of Internal Medicine VIII, University Hospital Tübingen, Otfried-Müller-Strasse 14, Tübingen, DE, 72076, Germany

^d Department of Biochemistry, Laboratory of Immunomodulation and New Therapeutic Approaches, Federal University of Pernambuco, Prof. Moraes Rêgo AVE, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2018

Received in revised form

17 September 2018

Accepted 8 October 2018

Available online 12 October 2018

Keywords:

Antioxidant activity

2-Thiazolylhydrazone

Chemometric

Cytotoxic activity

ABSTRACT

The antioxidant potential of a series of thiazolylhydrazone derivatives was investigated using three different methods namely DPPH, ABTS and FRAP assays. In general, the tested compounds showed higher or comparable activity to that of curcumin, used as positive control. Chemometric analyses demonstrated that the presence of hydrazone moiety is required for the activity of this class of compounds. From these results, compound **4** was identified as the most promising molecule and was then selected for further studies. The antiproliferative effect of compound **4** was evaluated, being active in three (T47D, MDA-MB-231 and SKMEL) of the six cancer cell lines tested, with IC₅₀ values ranging from 15.9 to 31.3 μM. Compound **4** exhibited no detectable cytotoxic effect on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) when tested at a concentration of 100 μM, demonstrating good selectivity. From these results, it is possible to infer that there is a correlation between antioxidant capacity and anticancer effects.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

APÊNDICE D - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA *CYTOKINE* (2019)

Ms. No.: CYTO-19-167

Title: Brain pre-metastatic niche modulates IP-10 from primary melanoma

Corresponding Author: Ms. Michelly Cristiny Pereira

Authors: Maria Clara Pinheiro Duarte Sampaio; Renata Virgínia Cavalcanti Santos; Amanda Pinheiros de Barros Albuquerque; , Maira Galdino da Rocha Pitta; Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego

Dear Ms. Pereira,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number: CYTO-19-167

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<https://ees.elsevier.com/cyto/>

Your username is: michelly2305@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/cyto/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to Cytokine + OA Mirror.

Kind regards,

Cytokine + OA Mirror

ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA


Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Wilson Campos, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 E-mail: (51) 3211-2115/8940 / 2129-8351
 Fax: (51) 3211-2129-8356
 www.ccb-ufpe.br

Recife, 27 de outubro de 2015.

Ofício nº 107/15

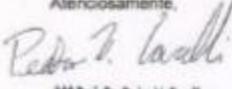
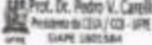
Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo**
 Núcleo de Pesquisa para Inovação Terapêutica Suely Galdino – CCB
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.012500/2015-09

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “Estabelecimento de um modelo *in vitro* para o estudo do microambiente do nicho pré-metastático e metástase cerebrais como ferramentas para a inovação terapêutica”.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Animais: ratos heterogênicos Wistar, idade: progenitores adultos e seus neonatos de 0 a 3 dias; Peso: 250-300g (adultos) e 7g (neonatos); Sexo: 40 machos e 120 fêmeas; Nº total de animais: 310 animais (160 progenitores e 150 neonatos).	Atenciosamente,  
---	---

RECEBIDO EM: 28 / 10 / 2015
 NOME: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
 ASSINATURA: 