

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

O receptor aril de hidrocarbonetos (AhR) em melanomas: associação com mutações
BRAF, com a progressão da doença e identificação de ligantes

MARIA CÁRMEN OLIVEIRA PINHO DE SALES

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS

Orientador: Prof. Dr^a Ana Campa
Coorientador: Prof Dr^a Silvy Stuchi Maria Engler

São Paulo
2020

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

O receptor aril de hidrocarbonetos (AhR) em melanomas: associação com mutações
BRAF, com a progressão da doença e identificação de ligantes

MARIA CÁRMEN OLIVEIRA PINHO DE SALES

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS

Orientador: Prof. Dr^a Ana Campa
Coorientador: Prof Dr^a Silvy Stuchi Maria Engler

São Paulo
2020

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

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

Sales, Maria Cármen Oliveira Pinho de
S163o O receptor aril de hidrocarbonetos (AhR) em melanomas: associação
com mutações BRAF, com a progressão da doença e identificação de
ligantes. / Maria Cármen Oliveira Pinho de Sales. -- São Paulo, 2020.
129p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em
Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).

Orientador: Campa, Ana

Coorientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi

1. Receptores : Biologia molecular 2. Expressão gênica. 3.
Bioquímica. I. T. II. Campa, Ana, orientador. III. Maria-Engler,
Silvy Stuchi, Coorientador.

574.88 CDD

Maria Cármen Oliveira Pinho de Sales

O receptor aril de hidrocarbonetos (AhR) em melanomas: associação com mutações BRAF, com a progressão da doença e identificação de ligantes

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

"Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito".

Martin Luther King Jr.

Conforme ofício circular nº 19/2018 CPG/CGSI/DPB/CAPES, de 23/11/18, referente a Portaria Capes nº206, de 4 de setembro de 2018: “O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

“This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Finance Code 001”

AGRADECIMENTOS

Esta trajetória foi árdua e de muito autoconhecimento!! Estes são alguns nomes de muitos a quem devo entregar meu mais profundo e sincero “Zambi na quartesa”!

A minha família de sangue, pelo brio, perseverança, suporte, incentivo e amor durante todos os anos do doutorado. Quem tem vocês têm tudo!!!

A minha família de axé, pelo entendimento, orientações, suporte e força que descobri ter. Sem todos os senhores nada seria possível!!!!

Aos meus amigxs dos dias de luta e dos dias de glória: Everson, Rafa Chagas, Lu, Dani, Ló, Ícaro, Sérgio, Helô, Julio, Gabriel, Raquel, Brother, Queridinha.

A todxs os queridxs que me ajudaram super: Larissa S, Joel, Isadora, Gabriela, Felipe “Massas”, Fabi, Sika, Gustavo, Jack, Victor, Gláucio, Bruna, Carol, Vivian B, Kiridã, Grazi, Dani e todos que me ouviram e apoiaram nas discussões científicas, da vida e de boteco.

A Ana Campa e Silvy Stuchi e, seus grupos de pesquisa pela oportunidade, espaço e divisão da rotina.

Aos demais professores, técnicos e funcionários da FCF pelo constante aprendizado e apoio.

A Marlene pelo carinho, profissionalismo e empatia nos momentos de sufoco.

As agências de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro neste projeto.

"Ninguém nasce feito, é experimentando-nos no mundo que nós nos fazemos".

Paulo Freire

Sales, M.C.O.P. **O receptor aril de hidrocarbonetos (AhR) em melanomas: associação com mutações BRAF, com a progressão da doença e identificação de ligantes.** 2020. 129 páginas. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele geneticamente diverso, que surge diante das transformações em melanócitos. A mutação BRAF^{V600E} está presente em mais de 90% de todas as mutações em BRAF, sendo assim ocorre em cerca de 50% dos casos registrados. As mutações em NRAS, ocupam o segundo lugar entre as mutações mais prevalentes, cerca de 20% dos casos. Informações sobre as assinaturas genéticas, permitiram o desenvolvimento de terapia alvo dirigida. O Vemurafenib, inibidor da quinase BRAF^{V600E}, apresentou inicialmente resultados bastante satisfatórios, contudo existe registro de casos de recidiva e resistência. O receptor aril de hidrocarbonetos é expresso em vários componentes da pele, e assim está relacionado a homeostase e fisiopatologia da pele. Diante disso, a avaliação da expressão do receptor em um painel de linhagens mutadas para NRAS e BRAF, e BRAF resistentes, mostrou-se maior do que a encontrada em melanócitos. Também encontramos maior expressão de mRNA de AhR em linhagens de melanoma derivadas de sítio primário e metastático, mutadas para BRAF^{V600E}, quando comparadas ao melanócito. Agregado a isto, a análise *in silico no TCGA (The Cancer Genome Atlas)* mostrou que há 18% de alteração genética em AhR, sendo em maior parte a alta regulação de mRNA. Também, a análise do banco público GSE12391, mostrou aumento de mRNA de AhR na fase de crescimento vertical do melanoma. Assim, concluímos que há maior expressão de mRNA e sua importância nas fases de desenvolvimento do melanoma, tanto nos processos iniciais quanto em processos de migração, invasão e metástase. Ainda, encontramos maior mRNA do receptor em linhagens resistentes ao Vemurafenib. Este resultado sustenta a hipótese de que AhR pode ser considerado um marcador de resistência em melanomas. O AhR, inicialmente no citoplasma, quando ativado pode atuar como fator de transcrição regulando vários genes que apresentam sequências definidas, participando de respostas carcinogênicas. Compostos halogenados e moléculas endógenas derivadas das vias de metabolização do triptofano são agonistas do receptor. Anteriormente, nosso grupo mostrou que linhagens de melanoma incubadas com triptamina e DMT exibiram menor clonogenicidade. Diante de uma literatura escassa sobre o papel do DMT no melanoma e com base nestes resultados, nosso objetivo foi avaliar o papel de AhR nesta interface DMT-melanoma. Para isto, nosso objetivo foi construir linhagem editada geneticamente para AhR através da ferramenta CRISPR-Cas9. Vários foram os esforços, sem sucesso, utilizados nas tentativas de comprovar a manutenção de células editadas na cultura. Atrémos a este resultado a possibilidade de haver duas subpopulações editadas geneticamente pós CRISPR-Cas9, onde uma destas manteve o padrão de crescimento semelhante às células *wild type*. Devido a este crescimento diferencial, não obtivemos congruências nos ensaios e postulamos a perda do possível nocaute. A partir disso, realizamos ensaios de interactoma para avaliar a interação de DMT-AhR. Nosso resultado sugere a interação de DMT ao receptor sigma 1, e não ao receptor aril de hidrocarbonetos. Desta forma, o interactoma sustenta a hipótese de que DMT não é um ligante de AhR. Para certificar este resultado análises de *docking* associados a ensaios biológicos, avaliando o papel do receptor, devem ser realizados para averiguar a afinidade e seletividade de DMT como ligante do receptor na linhagem de melanoma.

Palavras-chave: melanoma, mutação BRAF^{V600E}, receptor aril de hidrocarbonetos, CRISPR-Cas9, dimetilriptamina.

Sales, M.C.O.P. **The aryl hydrocarbon receptor (AhR) in melanomas: association with BRAF mutations, with disease progression and ligand identification.** 2020. 129 pages. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

ABSTRACT

Melanoma is a genetically diverse type of skin cancer, which arises from changes in melanocytes. The BRAF^{V600E} mutation is present in more than 90% of all BRAF mutations, so it occurs in about 50% of registered cases. Mutations in NRAS occupy the second place among the most prevalent mutations, about 20% of cases. Information on genetic signatures allowed the development of targeted therapy. vemurafenib, kinase inhibitor BRAF^{V600E}, initially presented very satisfactory results, however there is a record of cases of relapse and resistance. The aryl hydrocarbon receptor is expressed in several components of the skin and is thus related to homeostasis and skin pathophysiology. Therefore, the evaluation of receptor expression in a panel of strains mutated to NRAS and BRAF, and resistant BRAF, proved to be greater than that found in melanocytes. We also found main expression of AhR mRNA in melanoma strains derived from primary and metastatic site, mutated to BRAFV600E, when compared to melanocyte. Added to this, the *in silico* analysis in TCGA (The Cancer Genome Atlas) showed that there is 18% of genetic alteration in AhR, being mostly the high regulation of mRNA. Also, an analysis by the public bank GSE12391, showed an increase in AhR mRNA in the vertical growth phase of melanoma. Thus, it is concluded that there is greater expression of mRNA and its importance in the stages of development of melanoma, both in recent processes and in the processes of migration, invasion and metastasis. In addition, we found higher receptor mRNA in strains resistant to vemurafenib. This result supports the hypothesis that AhR can be considered a marker of resistance in melanomas. AhR, initially in the cytoplasm, when activated can act as a transcription factor regulating several genes that have defined sequences, participating in carcinogenic responses. Along with this, we show that along the tumor progression, there is an increase in AhR in the radial growth phase of melanoma. Halogenated compounds and endogenous molecules derived from the tryptophan metabolism pathways are receptor agonists. Previously, our group showed that melanoma strains incubated with tryptamine and DMT exhibited less clonogenicity. In view of a scarce literature on the role of DMT in melanoma and based on these results, our objective was to evaluate the role of AhR in this DMT-melanoma interface. For this, our goal was to build genetically edited strain for AhR using the CRISPR-Cas9 tool. Several efforts were unsuccessful in attempts to prove the maintenance of cells edited in the culture. We linked to this result the possibility of having two subpopulations genetically edited after CRISPR-Cas9, where one of them maintained the growth pattern like wild type cells. Due to this differential growth, we did not obtain congruence in the tests and postulated the loss of the possible knockout. From that, we performed interactome assays to evaluate the DMT-AhR interaction. Our result suggests the interaction of DMT with the sigma 1 receptor, and not the aryl hydrocarbon receptor. Thus, the interactome supports the hypothesis that DMT is not an AhR ligand. To certify this result, docking analyses associated with biological assays, evaluating the role of the receptor, should be performed to ascertain the affinity and selectivity of DMT as a ligand of the receptor in the melanoma lineage.

Keywords: melanoma, BRAFV600E mutation, aryl hydrocarbon receptor, CRISPR-Cas9, dimethyltryptamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Progressão tumoral segundo modelo proposto por Clark.....	3
Figura 2 – As mutações no desenvolvimento tumoral.	5
Figura 3 – Representação dos mecanismos de resistência primários.....	10
Figura 4 – Representação da estrutura do receptor aril de hidrocarbonetos.....	13
Figura 5 – Representação esquemática dos domínios de AhR, AhRR e ARNT.....	15
Figura 6 – Representação esquemática das interações de AhR após associação do ligante.....	17
Figura 7 – Esquema do metabolismo do triptofano pela via das quinureninas... ..	21
Figura 8 – Via serotoninérgica e seus metabólitos.	22
Figura 9 – Metabolismo do triptofano através da rota das triptaminas	23
Figura 10 – Biossíntese de DMT	26
Figura 11 – Fluxograma do processo de síntese de DMT	43
Figura 12 – Análise do transcrito de AhR em linhagens de melanoma mutadas para BRAF e NRAS em relação ao melanócito.....	49
Figura 13 – Análise <i>in silico</i> de AhR.....	49
Figura 14 – Boxplot da expressão de AhR nos estágios do melanoma: nevus comum, nevus displásico, melanoma RGP (fase de crescimento radial), melanoma VGP (fase de crescimento vertical) e metastático.....	50
Figura 15 – Comparação da expressão relativa do número de cópias do transcrito AhR em diferentes linhagens de melanoma parentais e resistentes.....	51
Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose dos vetores lentivirais <i>helpers</i> p59, p60 e p61 clivados por <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>	58
Figura 17 – Cultura de células empacotadoras HEK293FT 24 horas pós transfecção dos vetores lentivirais.....	61
Figura 18 – Análise do nocaute de AhR por <i>western blotting</i> na linhagem de melanoma Sk-Mel 147.....	62

Figura 19 – Cultura de células da linhagem SK-Mel147 após protocolo CRISPR-Cas9.....	63
Figura 20 – Variação da expressão de AhR na linhagem de melanoma SK-Mel147 após protocolo Crispr-Cas9.....	65
Figura 21 – Análise da recuperação do nocaute de AhR por <i>western blotting</i> na linhagem de melanoma SK-Mel147.....	66
Figura 22 – Análise do DMT sintetizado.....	72
Figura 23 – Estrutura química da dimetilriptamina.....	73
Figura 24 – Resultado da espectrometria de RMN do produto de síntese em relação ao núcleo H ¹	74
Figura 25 – Resultado da espectrometria de RMN do produto de síntese em relação ao núcleo C ¹³	75
Figura 26 – Análise de bioinformática (interatoma) de AhR e DMT.....	77
Figura 27 – Interações preditas de DMT.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Multiplicidade e a distribuição filogenética das várias formas de AhR....	11
Tabela 2 – Concentração de Vemurafenib usada no cultivo de linhagens de melanoma resistentes.....	33
Tabela 3 – Listagem das células e suas mutações para análise.	34
Tabela 4 – Tampão RIPA e inibidores de proteases utilizados na extração proteica	37
Tabela 5 – Fragmentos dos vetores <i>helpers</i> clivados com endonucleases para confirmação por padrão de clivagem.....	58
Tabela 6 – Sequências guias escolhidas e desenhadas para compor o sistema CRISPR-Cas9 para <i>knockout</i> de AhR em melanoma	59
Tabela 7 – Variações no protocolo de <i>Western blotting</i> para atingir a visualização da proteína (AhR) de linhagens celulares	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

3-HAA	Ácido antranílico
3HAA	Ácido 3-hidroxiantranílico
3HKyn	3-hidroxiquinurenina
5-OH-Trp	5-hidroxitriptofano
AA	Ácido antranílico
AADC	L-Aminoácido aromático descarboxilase
AhR	Receptor aril de hidrocarbonetos
Ahr1/ Ahr2/ Ahr3	Receptor aril de hidrocarbonetos
AhRR	Repressor do receptor aril de hidrocarbonetos
AIP (XAP/ARA9)	Proteína de interceptação de AhR tipo imunofilia
AKT	Proteína quinase B
AMPC	3´5´-adenosina monofosfato cíclico
APCs	Células apresentadoras de antígeno
A-RAF	Proteína quinase serina/treonina A-Raf
ARNT	Translocador nuclear do receptor aril
ATP	Adenosina trifosfato
AVP	Vasopressina arginina
Bcl-a	Linfoma de células B2
bHLH	Básico-hélice-alça-hélice
BRAF	Homônimo do oncogene viral de sarcoma murino v-raf B
CAS	Susceptibilidade à apoptose celular catalítica alfa - p110 α
cdk2	Quinase dependente de ciclina 2
cdk4	Quinase dependente de ciclina 4
cDNA	DNA complementar
CIBio	Comissão Interna de Biossegurança
COT	Cancer osaka tireoide - MAP3K8 quinase da proteína quinase ativada por mitógeno 8)
C-R AF	Proteína quinase serina/treonina proto-oncogene RAF
CRISPR-Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Associated protein-9 nuclease – curtas repetições palindrômicas agrupadas regularmente

interespaçadas associadas a proteína nuclease 9

C-S RC	Proteína tirosina quinase c-Src
cyp1a	Membro 1 da subfamília 1 a da família do citocromo P450
cyp1b	Membro 1 da subfamília 1 b da família do citocromo P450
cyp1c	Membro 1 da subfamília 1 c da família do citocromo P450
DMEM	Meio de <i>Eagle</i> Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	N,N-dimetiltriptamina
DMT-NO	Óxido-N-DMT
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos fosfatados
E2	Proteína ubiquitina-ligase E2
E3	Proteína ubiquitina-ligase E3
ECL	Quimioluminescente apropriado (<i>enhanced chemiluminescent</i>)
EGFP	Proteína verde fluorescente aprimorada
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
eIF2 α	Fator iniciação eucariótico 2 α
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FAK	Quinase de adesão focal
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICZ	6-formilindol- (3,2-b) –carbazol
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC-MS	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
GFP	Proteína fluorescente verde
HAH	Hidrocarbonetos aromáticos halogenados
HDMT	5-hidroxi-DMT
HDR	Reparo dirigido a homologia
HIF-1 α	Fator 1-alfa induzível por hipóxia
HSP90	Proteína choque térmico 90
HTR1A	5-hidroxitriptamina receptor 1A acoplado a proteína G
HTR1D	5-hidroxitriptamina receptor 2A acoplado a proteína G
HTR2C	5-hidroxitriptamina receptor 2C acoplado a proteína G

HTR2A	5-hidroxitriptamina receptor 2A acoplado a proteína G
HTR2B	5-hidroxitriptamina receptor 2B acoplado a proteína G
HTR6	5-hidroxitriptamina receptor 6 acoplado a proteína G
IAA	Ácido indolacético
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ	Interferon gama
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INMT	Indoletilanimina-N-metiltransferase
ITE	1'H-indol-3'-carbonil -tiazol-4-carboxílico
JNK	Quinase N-terminal Jun
KAT I/KAT II	Quinureninas aminotransferase
K _d	Constante de dissociação
KIT	Receptor tirosina quinase
KRA	Homólogo oncogene viral de sarcoma de rato Kirsten
KRAS	Homólogo oncogene viral de sarcoma de rato Kirsten
Kyna	Ácido quinurênico
LB	Luria Bertani
MAO-A	Monoamino oxidase A
MAOI	Inibidor da monoamino oxidase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDMT	5-metoxi-DMT
MEK	Quinase ativadora da MAP quinase
MITF	Fator de transcrição associado a melanogênese
MMP1	Metaloproteinase de matriz 1
MMP-2	Metaloproteinases da matriz 2
MMPs	Metaloproteinases de matriz MP
MP	Melanócito
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo de mamíferos da rapamicina
N.R	Não registrado
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NES	Sinal de exportação nuclear

NF1	Neurofibromina 1
NF-kB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
NHEJ	Não homóloga de união final
NLS	Sinal de localização nuclear
nm	Nanômetro
NMT	N-metiltriptamina
NRAS	Homólogo do oncogene viral RAS de neuroblastoma
Pb	Pares de bases
p.Q61K	Substituição <i>missense</i> na posição 61, Q-K
p.Q61R	Substituição <i>missense</i> na posição 61, Q-R
p.V600E	Substituição <i>missense</i> na posição 600, V-E
p16	Proteína p16
p16INK4A	Proteína inibidora de quinase dependente de ciclina 2A
p21	Proteína p21
p23	Proteína p23
p27	Proteína p27
p53	Proteína p53
PAHs	Hidrocarbonetos aromáticos cíclicos
PAS A	Homologia PER-ARNT-SIM A
PAS B	Homologia PER-ARNT-SIM B
PBS	Tampão fosfato-salino
PER	Proteína circadiana do período
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase
PI3KCA	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase subunidade
PIC	Ácido picolínico
PIK3CG	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3 quinase subunidade
PNKD	Disquinésia não quinesigênico paroxismal
PTEN	Fosfatase e tensina homólogo
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo
Quin	Ácido quinolínico
Rac 1	Pequena GTPase 1 da família RAC

RAF	Acrônimo de fibrosarcoma rapidamente acelerado
RAS	Vírus do sarcoma de rato
RB	Retinoblastoma
RB1	Co-repressor transcricional RB 1
RBB2	Receptor tirosina-proteína quinase erbB-2
RGP	Fase de crescimento radial
RhoA	Membro A homólogo da família RAS
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SAM	S-adenosil-metionina
SER	Serotonina
SFB	Soro fetal bovino
SIGMA1	Receptor intracelular sigma não haplóide 1
SIM	Homólogo obstinado 1
TAD	Domínio de transativação
TALEs	Proteínas ativadoras de transcrição
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TDO	Triptofano 2,3-dioxigenase
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
Th17	Células T <i>helper</i> 17
THAP1	Proteína 1 associado a apoptose contendo domínio
THH	Tetrahidroharmina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TP53	Proteína tumor p53
Tregs	Células T regulatórias
tRNA	Ácido ribonucléico transportador
Try	Triptamina
UV	Ultravioleta
vav3	Fator de troca nucleotídeo guanina 3 vav
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

VGP	Fase de crescimento vertical
vsr-c	Não-receptor tirosina quinase SRC
WT	do inglês <i>Wild type</i> – selvagem
XRE	Elementos responsivos a xenobióticos
ZFNs	do inglês “ <i>zinc-finger</i> ” (dedos de zinco)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer de pele: tipos e estatísticas.....	1
1.2. O desenvolvimento do melanoma: causas e progressão	2
1.3. As mutações na formação e progressão do melanoma.....	4
1.4. As mutações BRAF e NRAS no melanoma.....	6
1.5. A terapia e resistência no melanoma.....	8
1.6. O receptor aril de hidrocarbonetos – AhR.	11
1.6.1. O receptor: genética e evolução.....	11
1.6.2. Estrutura da proteína.....	12
1.6.3. O receptor e seus ligantes.	15
1.6.3.1. Ativação, translocação nuclear e degradação proteica.....	15
1.6.4. Os ligantes de AhR.	17
1.6.5. Os alvos de AhR e suas respostas biológicas.....	18
1.6.6. Outras vias de sinalização de AhR: via não genômica.....	19
1.7. Metabolismo do triptofano	20
1.7.1. Via das quinureninas.....	20
1.7.2. Via serotoninérgica.....	22
1.7.3. Via das aminas-traço.....	23
1.7.4. O mundo alucinógeno das triptaminas.	24
1.7.4.1. N, N-Dimetiltriptamina (DMT).....	24
1.7.4.1.1. A síntese de DMT	25
1.7.4.1.2. O metabolismo de DMT	26
1.7.5. O metabolismo do triptofano e o câncer.....	27
1.7.5.1. Depleção de triptofano e o sistema imune: via das quinureninas... ..	27
1.7.5.2. A via serotoninérgica e o câncer.....	28
1.7.5.3. A via das triptaminas e o câncer.....	29
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Células.....	33

4.1.1. Cultivo celular de melanomas parentais e resistentes.	33
4.1.2. Células utilizadas para desenvolvimento da técnica CRISPR-Cas9 ...	34
4.2. Extração de RNA total, obtenção de cDNA e qPCR	35
4.2.1. Extração de RNA total.....	35
4.2.2. Transcrição reversa (RT-PCR) e síntese de cDNA.....	35
4.2.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR.....	36
4.3. <i>Western blotting</i>	36
4.3.1. Extração de proteína total.	36
4.3.2. Quantificação proteica.....	37
4.3.3. Condições do gel, transferência e revelação.....	38
4.4. Extração de DNA vetorial.	38
4.5. Clivagem de DNA vetorial.....	38
4.6. Eletroforese de gel de agarose.....	39
4.7. Determinação da sequência de nucleotídeos de DNA.	39
4.8. Desenhos das sequências guias, clonagem e construção de vetores.....	39
4.9. Protocolo CRISPR-Cas9	40
4.9.1. Transfecção lentiviral em células HEK293FT.....	40
4.9.2. Infecção de células tumorais.....	41
4.10. Síntese de dimetilriptamina (DMT).	42
4.10.1. Análise em espectrometria de massas.....	43
4.10.2. Análise em RMN (ressonância magnética nuclear).....	44
4.11. Análises de bioinformática.....	44
4.11.1. Análise <i>in silico</i> de AhR no banco de dados	44
4.11.2. <i>Boxplot</i> da expressão de AhR nos estágios do melanoma	44
4.11.3. Interactoma entre AhR e DMT	45
4.12. Análise estatística.....	45
5. RESULTADOS	46
CAPÍTULO I – expressão do receptor aril de hidrocarbonetos em linhagens de melanoma mutadas para BRAF, NRAS e resistentes ao Vemurafenib.....	47
5.1. Quantificação da expressão basal de mRNA de AhR em células de melanoma e melanócito.....	48
5.2. Discussão	51
CAPÍTULO II – Construção de linhagem nocaute para o receptor aril de hidrocarbonetos.	56

5.3. Construção do vetor e da sequência guia – CRISPR-Cas9	57
5.4. Discussão	66
CAPÍTULO III – O receptor aril de hidrocarbonetos e a identificação do ligante	70
5.5. AhR e identificação de ligante	72
5.6. Discussão	78
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS	84
8. ANEXOS.....	96
8.1. Anexo 1- Histórico escolar do aluno (ficha do aluno).....	96
8.2. Anexo 2 – Currículo Lattes do aluno	98
8.3. Anexo 3 – Comissão Interna de Biossegurança (CIBio).....	102
8.4. Anexo 4 – Mapas dos vetores usados no projeto.....	103
8.4.1. Vetor lentCRISPRv2 (Addgene).....	103
8.4.2. Vetor <i>helper</i> p59.....	104
8.4.3. Vetor <i>helper</i> p60.....	105
8.4.4. Vetor <i>helper</i> p61.....	106
8.4.5. Vetor pPIC9K (Invitrogen).	107

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de pele: tipos e estatísticas

O câncer de pele pode ser categoricamente dividido em três tipos: carcinoma de célula basal, carcinoma de célula escamosa e melanoma maligno cutâneo ⁽¹⁾.

De modo geral, o câncer de pele não melanoma corresponde a quase 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, sendo o mais frequente. Se detectado precocemente pode-se elevar os percentuais de cura, apresentando baixa mortalidade, contudo se não tratado corretamente pode levar a casos de mutilações. Muito raro em crianças, mas muito comum em pessoas que tem constante exposição aos raios solares, de pele clara, com histórico familiar ou ainda com doenças cutâneas prévias ⁽²⁾.

O câncer basocelular é o mais comum podendo se originar de células sebáceas da pele, sendo encontrado preferencialmente na região da cabeça e pálpebras. Em geral, são tumores que raramente se metastizam devido à baixa sobrevivência celular do tecido dermal. Já o carcinoma de células escamosas se desenvolve na face, mãos e em membranas mucosas e genitais, podendo metastizar hematologicamente e para linfonodos ⁽¹⁾.

Estima-se para 2020 que os cânceres de pele não melanoma podem chegar a 176.930 mil casos no país, destes 83.770 casos em homens e 93.160 casos em mulheres ⁽²⁾. Considerados menos agressivos, em 2015 foram contabilizados 1.958 casos de morte no Brasil, sendo 1.137 casos em homens e 821 casos em mulheres ⁽³⁾.

O melanoma é um dos tipos mais agressivos de câncer de pele ⁽⁴⁾. O melanoma cutâneo maligno representa de 4 a 11% dentre todos os tipos de câncer de pele, contudo é responsável por 75% das mortes relacionadas a este tipo de tumor. No ano de 2015, foram contabilizados 1.704 casos de mortes no país, divididos em 1.012 homens e 782 mulheres ⁽³⁾. Entre 2016-2017, estimou-se a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer no país, sendo que em 2016 foram contabilizados 5670 casos de câncer de pele tipo melanoma. No Brasil, 30% de todos os tumores são de câncer de pele e o tipo melanoma representa 3% das neoplasias malignas da pele ⁽³⁾. Em 2020, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 8.450 novos casos no Brasil: sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres ⁽²⁾. Apesar de pouco prevalente, o melanoma é o mais grave devido à alta probabilidade

de metástase ^(3,4,5,6) sendo responsável por 75% dos óbitos por câncer de pele ⁽⁷⁾.

1.2. O desenvolvimento do melanoma: causas e progressão

O melanoma surge de lesões nos nevos melanocíticos. Os melanócitos são células derivadas da crista neural que podem compor algumas partes do corpo, como olhos e a pele, e devido a essa abrangência podem dar origem a diversos tipos de melanoma ⁽⁸⁾. Na pele são encontrados cerca de 1.500 melanócitos por milímetros de epiderme humana. Apresentam infrequente divisão celular, menos que duas vezes por ano. A principal função do melanócito é promover a melanina para as células vizinhas, os queratinócitos. A proliferação dos melanócitos e a produção do pigmento é estimulada pelos danos no DNA (ácido desoxirribonucleico) induzidos por raios ultravioleta (UV) nos queratinócitos. A melanina é uma macromolécula complexa que absorve a radiação UV. Os queratinócitos da epiderme a usam para proteger seus núcleos de danos no DNA induzidos por esta radiação, sendo assim os melanócitos são importantes na defesa contra danos ao material genético celular ^(8,9).

A transformação maligna dos melanócitos da pele ⁽⁵⁾ pode ser resultante de uma interação complexa entre fatores genéticos, constitucionais (como idade e o número, tamanho e tipo dos nevos pigmentados) e ambientais (exposição à luz solar) ⁽⁶⁾. A radiação ultravioleta é considerada o principal fator ambiental que favorece o processo carcinogênico causando danos ao DNA através da formação de dímeros de pirimidina, fotoprodutos, mutações genéticas e espécies reativas de oxigênio ^(7,10).

A progressão do melanoma pode ser categorizada em alguns estágios definidos inicialmente pelo modelo proposto por Clark (figura 1). Este modelo compreende a divisão em fases de progressão de acordo com mudanças histológicas, derivadas de mutações em genes que contribuem para a progressão tumoral ⁽⁹⁾.

Assim, a primeira mudança nos melanócitos é o desenvolvimento do nevo benigno. Nesta etapa o controle de crescimento celular melanocítico é interrompido pela ativação ilimitada de vias oncogênicas, como por exemplo a via de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), resultando na ativação de NRAS e BRAF que são associadas a 50% dos melanomas, aumentando o número de melanócitos

ao longo da camada basal da pele, ainda que de forma regular. Este ponto ainda não pode ser caracterizado como câncer, já que um nevo raramente progride para câncer. A maioria dos nevos podem ser manter por longo tempo estáticos, após a fase de proliferação mais intensa. Eles precisam sofrer adicionais alterações moleculares para se tornarem malignos ⁽⁹⁾.

A segunda etapa é o desenvolvimento de um crescimento anômalo e assimétrico, com bordas irregulares, várias colorações e tamanhos. Histologicamente é possível observar lesões citológicas aleatórias e descontínuas. Esta etapa tem origem a partir da fase anterior do nevo benigno ou pelo aparecimento de novas lesões. As lesões genéticas aumentam a probabilidade do nevo displásico se tornar maligno ou aumentam a taxa de desenvolvimento de um novo melanoma sem um precursor. A fase de crescimento radial, exibe um perfil de proliferação celular intraepidêrmica. As lesões originadas não são mais aleatórias, em vez disso exibem um padrão. Na fase de crescimento vertical, a lesão progride para um crescimento vertical adquirindo habilidade de invadir a derme e expandir nódulos. Estas células são capazes de formar um tumor se infectadas em um camundongo ou crescidas em ensaios de *soft agar*. A última etapa compreende o sucesso do espalhamento para outras áreas da pele e órgãos, proliferando e estabelecendo pontos metastáticos, nomeada de melanoma metastático ⁽⁹⁾.

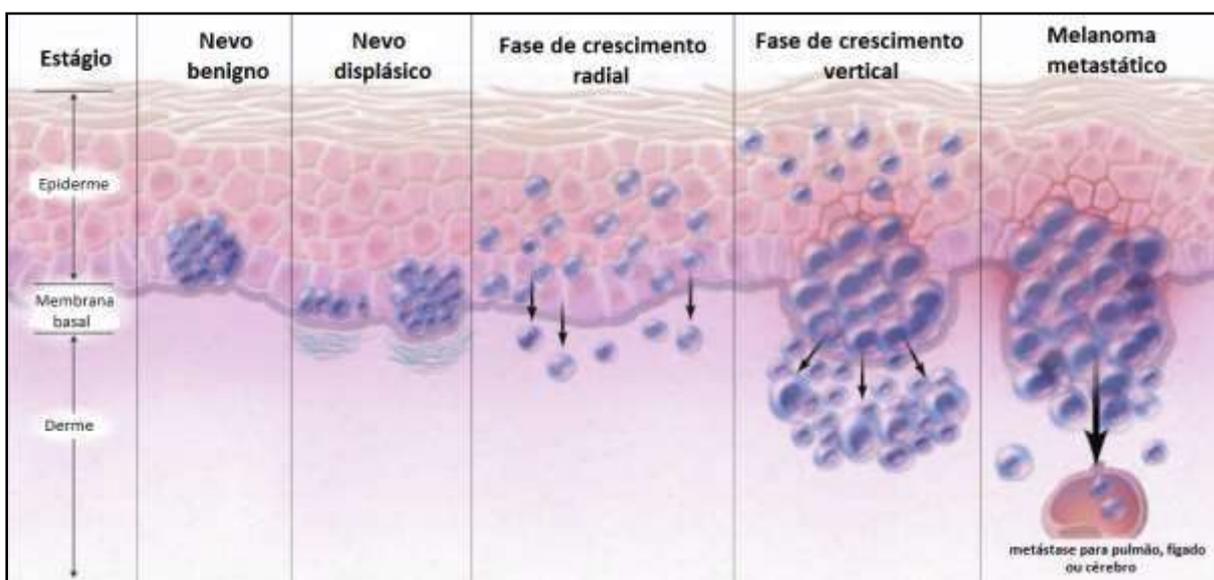


Figura 1 - Progressão tumoral segundo modelo proposto por Clark. Em cada estágio da progressão do melanoma - nevo benigno, nevo displásico, fase de crescimento radial, fase de crescimento vertical e melanoma metastático, pode-se observar a expansão das células tumorais (representadas pelos círculos roxos) em cada camada da pele – epiderme, membrana basal e derme. Adaptado de Miller e Mihm (2006)⁽⁹⁾.

1.3. As mutações na formação e progressão do melanoma

As transformações histológicas ao longo do desenvolvimento tumoral vêm acompanhadas de mutações genéticas. Sendo assim, podemos dizer que o melanoma se desenvolve a partir de um conjunto de mutações resultantes dos danos ao material genético dos melanócitos ⁽¹¹⁾, e que as mutações acompanham as fases de progressão do melanoma ^(8,9).

Na fase de nevus e lesões intermediárias pode-se constatar as mutações na via de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) com papel importante na iniciação tumoral. Geralmente as mutações são nos oncogenes BRAF (homólogo B do sarcoma viral murino v-raf), NRAS (homólogo do oncogene viral RAS de neuroblastoma) e NF1 (neurofibromina 1), sejam elas mutações *missenses* ou deleções. Durante o estágio de progressão podemos citar os genes alvos, TERT (transcriptase reversa da telomerase) e RB (retinoblastoma), codificante da proteína telomerase que respectivamente atuam no telômero e no avanço do ciclo celular, conduzindo a uma fuga da morte celular e consequente proliferação continuada. Nos estágios de melanoma invasivo, pode-se destacar ação das proteínas PI3K e p53 (proteína p53) codificadas pelos genes PI3K (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase) e TP53 (proteína tumor p53) ^(8,12). Além destes, nos estágios de fase de crescimento vertical e metastático acrescentam-se a perda de E-caderina e o aumento da expressão de MMP-2 (metaloproteinases da matriz 2) corroborando para a propensão metastática tumoral ⁽⁹⁾.

Ainda, dentre os alvos mutados envolvidos em processos biológicos importantes no contexto tumoral, podem ser citados o KIT (receptor tirosina quinase), demais componentes da via de MAPK, a proteína PTEN (fosfatase e tensina homólogo), p16INK4A (proteína inibidora de quinase dependente de ciclina 2A), pRb (proteína retinoblastoma - proteína RB), MITF (fator de transcrição associado a melanogênese), AKT (proteína quinase B) por exemplo ^(8,9,11).

A figura 2 representa uma visão geral das proteínas participantes das cascatas de sinalização das vias de MAPK e PI3K, as vias constitutivamente ativas mais relacionadas à patogênese do melanoma ^(4,12). A via de MAPK participa de uma ampla rede de comunicação celular, integrando várias funções no organismo, ativando mensageiros secundários e proteínas quinases. Estes agentes sinalizadores comandam processos chaves no contexto tumoral como a proliferação,

a diferenciação celular, morte celular e migração ^(12,13).

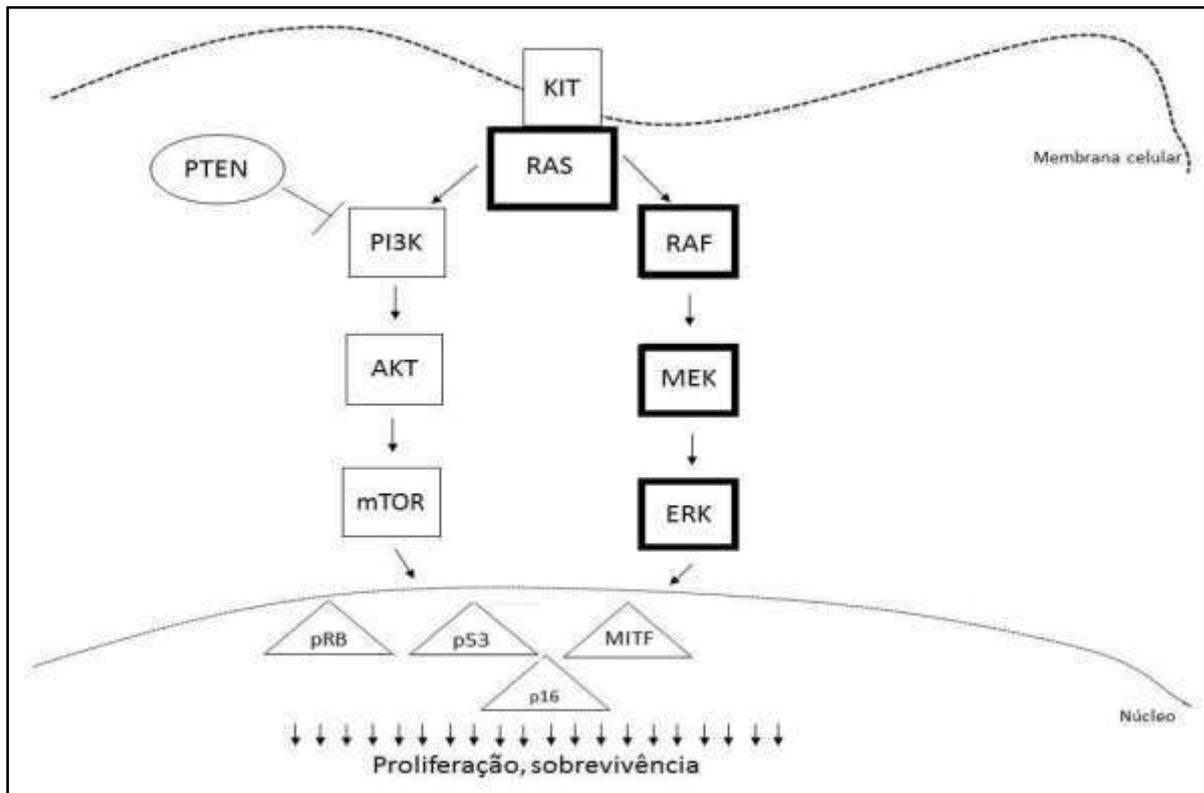


Figura 2 - As mutações no desenvolvimento tumoral. As principais mutações no melanoma: a via de MAPK (composta pelas proteínas RAS, RAF, MEK e ERK - em destaque (caixa preta), e a segunda via ativada por RAS (PI3K-AKT-mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos)). Ambas as vias fazem parte de uma cascata de sinalização, transferindo sinais extracelulares da membrana celular para o núcleo via fatores de transcrição como o MITF e proteínas associadas (pRb, p53, p16 (proteína p16)), levando a fenótipos de sobrevivência e proliferação celular. Adaptado de Swick (2011) ⁽¹¹⁾; Romano (2012) ⁽¹⁴⁾.

As mutações em proteínas integradas à via de sinalização MAPK estão presentes em mais de 50% dos melanomas cutâneos ⁽¹²⁾. Dentro da via de MAPK os oncogenes mais afetados são BRAF (homólogo B do sarcoma viral murino v-raf) e NRAS (homólogo do oncogene viral RAS de neuroblastoma), que são os genes de maior taxa de mutação em melanomas ^(7,8,12). Estas mutações podem levar à ativação dos efetores da via de MAPK, a proteína RAS (vírus do sarcoma de rato), RAF (acrônimo de fibrosarcoma rapidamente acelerado), MEK (quinase ativadora da MAP quinase) e ERK (quinase regulada por sinal extracelular) ⁽¹⁵⁾. Em uma sinalização normal em melanócitos, a proteína de membrana NRAS ativa BRAF, que então ativa uma segunda proteína quinase, MEK, que fosforila a proteína ERK ⁽¹⁵⁾. Esta via é a principal moduladora da proliferação em melanomas que apresentam a

proteína ERK ativada em 90% dos casos. A ativação desta via resulta em processos celulares importantes, tais como proliferação celular, sobrevivência, diferenciação e migração ⁽¹²⁾. As mutações nas proteínas NRAS e BRAF são as mais prevalentes nesta via ^(9,12,15). Uma vez mutada, estas proteínas conferem ganho de função na sinalização celular, porque a proteína NRAS também é capaz de ativar a PI3K ⁽¹²⁾.

A via de PI3K é a segunda ativada por RAS. A mutação em PI3K pode ocorrer em baixa frequência, mas a mudança na via acontece por mutações em PTEN. As mutações em PTEN são observadas em 40% dos melanomas ^(11,12). PTEN é um *down*-regulador de AKT ⁽¹¹⁾. A proteína AKT participa de processos que ativam o ciclo celular ou estimulam a apoptose, de modo que modifica proteínas facilitando a proliferação e sobrevivência celular ⁽¹⁵⁾.

1.4. As mutações BRAF e NRAS no melanoma

A quinase BRAF faz parte de uma família de proteínas ativadas por RAS e é uma das ativadora da via de MAPK/ERK. Esta família compreende além da BRAF as proteínas C-RAF (proteína quinase serina/treonina proto-oncogene RAF) e A-RAF (proteína quinase serina/treonina A-Raf) ⁽²⁰⁾. A atividade de BRAF é superior em relação às demais proteínas da mesma família. E esta característica, pode justificar fortemente a frequente ativação mutacional observada nesta proteína nos tumores humanos ⁽²¹⁾.

Em melanomas, há alta incidência da mutação em BRAF (aproximadamente 50%), sendo que 90% desta mutação ocorre no aminoácido 600 (BRAF^{V600E}). Assim, acima de 90%, as mutações em BRAF resultam na troca de um único nucleotídeo na posição 1799. Esta mutação troca uma timina por uma adenosina, que deriva na troca do códon (GTG>GAG), e conseqüentemente na troca do aminoácido valina por ácido glutâmico (BRAF^{V600E}) ⁽²¹⁾. Esta troca leva a uma BRAF insensível a *feedback* negativos ⁽²¹⁾ e constitutivamente ativa ^(21,22).

A BRAF^{V600E} participa de diferentes processos na progressão do melanoma, principalmente na ativação *downstream* de MEK/ERK, fuga da senescência e apoptose, alto potencial replicativo, angiogênese (através da ativação de HIF-1 α (fator 1-alfa induzível por hipóxia) dependente de MEK e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)), invasão e metástase (através da *upregulation* de

proteínas envolvidas na migração, sinalização de integrinas e contratilidade celular, MMP1 (metaloproteinase de matriz 1))^(21,23) e ainda evasão da resposta imune⁽²¹⁾.

A mutação NRAS está presente em cerca de 15-20% dos melanomas, e é considerada a segunda mutação oncogênica mais comum que ocorre na família RAS, após as mutações BRAF^(21,24). A proteína NRAS, junto com as KRAS e HRAS são os primeiros oncogenes descobertos em tumores humanos e as três fazem parte da família de proteínas RAS GTPase⁽²²⁾. KRAS e HRAS apresentam-se mutadas em apenas 2% e 1% dos pacientes respectivamente⁽²³⁾.

A maior mutação pontual em NRAS, acima de 80%, consiste na substituição da glutamina por leucina na posição 61, sendo que ainda pode ocorrer mutações nas posições 12 e 13. Uma vez que NRAS está mutada, a via RAS-RAF-MAPK e PI3K-PTEN estão constitutivamente ativas. Assim, a sinalização celular é bastante similar à induzida por BRAF, resultando na indução da desregulação do ciclo celular, de vias pró-sobrevivência e proliferação celular⁽²⁵⁾.

Ambas as mutações resultam na ativação de efetores *downstream* da via RAS-RAF-MEK-MAPK que é importante em vários processos, tais como proliferação, migração e regulação da apoptose celular dirigindo assim para a promoção do desenvolvimento tumoral^(17,26). As mutações NRAS e BRAF que sinalizam para várias vias celulares, e que ativam constitutivamente a via RAS-RAF-MAPK e PI3K-AKT, raramente são simultâneas, já que a mutação NRAS sustenta eficientemente estas vias tanto a mutação em BRAF⁽²²⁾.

No aspecto clínico, a presença de mutação NRAS remete a um pobre prognóstico, geralmente muito agressivo e de alta metástase quando comparado com melanoma mutado para BRAF ou melanoma sem as mutações NRAS e BRAF^(21,22).

Estudos sobre as alterações genéticas majoritárias no melanoma levaram a segregação em dois subgrupos: os tumores mutados para NRAS e BRAF. Alguns autores apontam que estas mutações são mutuamente excludentes na maioria dos casos^(21,24). Entretanto, Chiappetta e seus colaboradores (2015) apontam para uma simultaneidade entre as mutações NRAS e BRAF no mesmo tumor, desde que sejam em frequências diferentes⁽¹⁵⁾.

Embora classicamente a via de MAPK seja ativada pelas mutações clássicas apontadas acima, melanomas sem as mutações em BRAF e RAS apresentam outros mecanismos autócrinos, que favorecem o crescimento e progressão tumoral,

e também mecanismos de resistência ⁽²³⁾. O avanço do conhecimento sobre a heterogeneidade molecular do melanoma levou a elucidação de mecanismos de resistência.

1.5. A terapia e resistência no melanoma

Ao longo da última década, grandes avanços foram feitos na tentativa de desvendar a biologia do melanoma ⁽¹¹⁾. O aumento de informações sobre os eventos moleculares envolvidos no desenvolvimento do tumor tem levado a identificação de novos alvos e a criação de novos agentes terapêuticos direcionados. Em 2002, quando foi identificado que 50% dos melanomas continham a mutação BRAF (mutação V600E) foi considerado o uso de terapia direcionada para este tipo característico de tumor ⁽⁴⁾.

Com este propósito, o medicamento Vemurafenib (PLX4032, RG7204), um inibidor da quinase BRAF^{V600E}, foi desenvolvido ⁽²⁸⁾. O Vemurafenib é uma pequena molécula que tem alta afinidade pela bolsa de ligação ao ATP (adenosina trifosfato) da BRAF^{V600E} mutada. Desta forma, o Vemurafenib se liga no site ativo do domínio da quinase, bloqueando o acesso ao ATP ⁽²⁹⁾. Contudo, mesmo com efeitos iniciais satisfatórios há registros recorrentes de recidiva ⁽³¹⁾.

Uma questão importante para o desenvolvimento de fármacos alvos específicos está relacionada ao desenvolvimento de resistência. Nem todos os pacientes tratados com inibidores de BRAF^{V600E} respondem positivamente ao tratamento, e dentro de meses é possível o desenvolvimento de resistência. Vários são os mecanismos relatados na resistência tumoral a inibidores de BRAF^{V600E}. Acredita-se que os mecanismos envolvidos na sobrevivência e adaptação dos tumores aos inibidores de BRAF mutada estão relacionados direta e indiretamente a via de MAPK ⁽³²⁾.

Acredita-se que a resistência ao Vemurafenib é conduzida principalmente pela reativação de ERK, o efetor *upstream* na via de MAPK devido a mudanças nas vias de sinalização ^(28,33). Neste sentido podem-se apontar dentre as estratégias para isto: as reações de *splicing* dimerizando mutações BRAF^{V600E} e a seleção de células BRAF *naive* ⁽²⁸⁾. Algumas evidências sustentam a reativação da via de MAPK, seja pelo aumento da expressão de COT (cancer osaka tireoide - MAP3K8 quinase da proteína quinase ativada por mitógeno 8), que ativa ERK sem a sinalização de RAF

(32). Ou mesmo a ocorrência de mutações secundárias em NRAS (como a Q61K) e ainda o desenvolvimento de mutações ou deleções em MEK1 (32,33).

Outra terapia alvo contra a constante ativação da via de MAPK, resultante de células que carregam a mutação BRAF^{V600E}, são os inibidores de MEK. Contudo vários mecanismos de resistência a esta terapia também foram identificados. A célula tumoral contendo a mutação BRAF^{V600E} não precisa da ativação de RAS para a sinalização da cascata de MEK-ERK. Desta forma, um mecanismo de resistência primária seria derivado da constante ativação de ERK, que gera um *feedback* de menor expressão de RAS nestas células e ainda uma ativação de PI3K pela ligação incomum do ligante ao receptor de tirosina quinase na membrana celular (figura 3).

Uma vez que existe a presença do inibidor de BRAF^{V600E}, há um retorno da expressão de RAS e reativação da via de MAPK (34). Dentre os mecanismos de resistência primária e reativação de MAPK podemos citar o desenvolvimento das mutações em NRAS. De fato, este ganho de variadas modificações genéticas pode causar a formação de diferentes subclones no mesmo tumor ou em diferentes sítios metastáticos, resultando em um aumento da heterogeneidade no mesmo paciente (15).

Um mecanismo de resistência acessório é a ativação da via de PI3K. Neste caminho há relatos de deleções em PTEN e mutações AKT dirigindo a uma sinalização melhorada de PI3K/AKT/mTOR (mTOR - alvo de mamíferos da rapamicina), em vez da reativação de MAPK (18, 30,33) (34). A perda de ativação de PTEN conduz a um aumento da atividade de AKT, onde as células eram menos susceptíveis a morte, apresentam um aumento da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (linfoma de células B2), (34) considerada um proto-oncogene (36). Ainda, a inativação de PTEN pode ser associada ao gene RB1 conduzindo a uma forçada ativação da via de MAPK em melanomas mutados para BRAF^{V600E} (34).

A resistência secundária e adaptativa se baseia na seleção clonal de células resistentes às terapias empregadas formando uma subpopulação responsável pela progressão da doença (35).

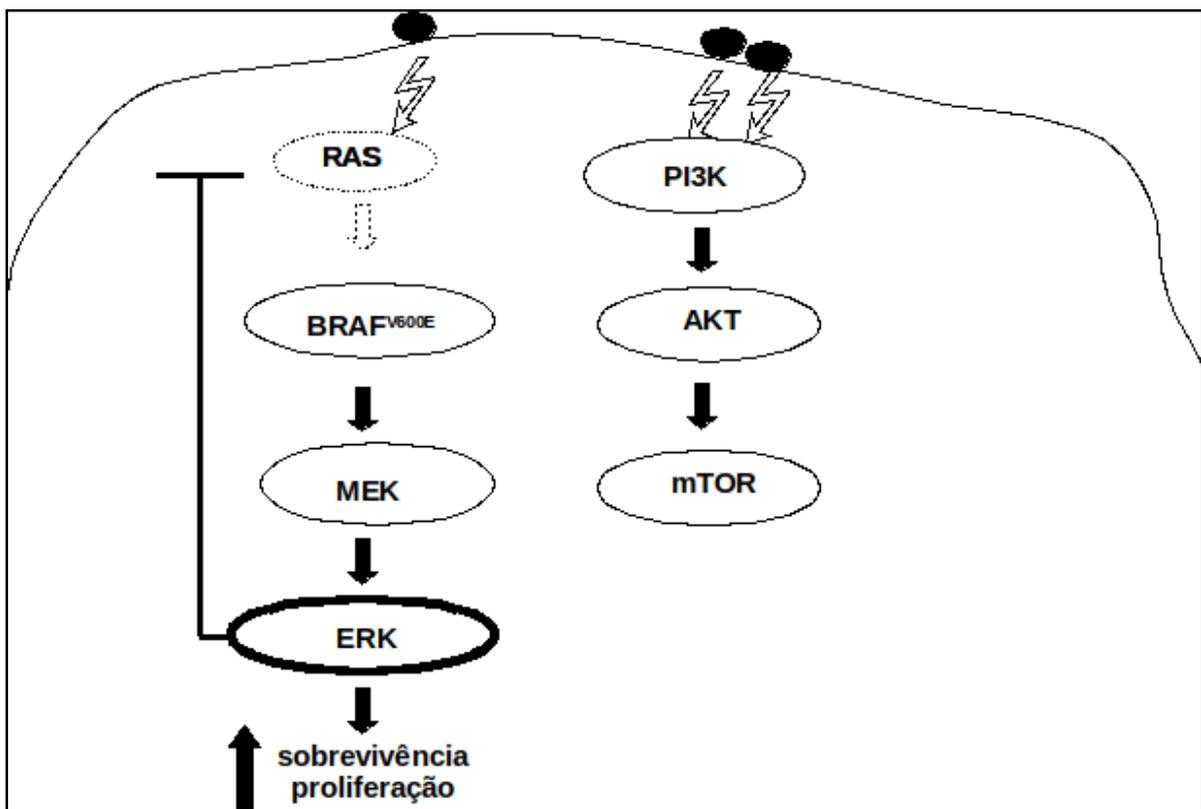


Figura 3 - Representação dos mecanismos de resistência primários. A vida de MAPK é mantida ativa constitutivamente através de interações entre os ligantes (raios) e o receptor de tirosina quinase (círculos). A ativação extrema (linha cheia) de ERK conduz a um *feedback* negativo resultando na diminuição da expressão de RAS e ativação de PI3K sob ligantes incomuns ao receptor de tirosina quinase (raios), favorecendo fenótipos de sobrevivência e proliferação. Adaptado de Amaral (2017) ⁽³⁴⁾.

A inibição de BRAF, em células mutantes para NRAS, que ativa as proteínas CRAF, superativa MEK e ativa ERK conduzindo a uma retomada da via de MAPK. Ainda, a resistência pode vir através da dimerização de BRAF^{V600E} por *splicing*, amplificação de BRAF, mutações ativando MEK (MEK1Q56P e MEK1E203K) e ERK, a perda de MITF correlacionando ao ganho de expressão dos receptores de tirosina quinase, a perda de expressão ou atividade de PTEN favorecendo o eixo PI3K-AKT além de mutações nos componentes desta via. Vários estudos têm sido feitos sobre este tema, com objetivos comuns de associar alvo e imunoterapia. O emprego de terapias direcionadas é bastante interessante no combate ao início da resistência, mas deve-se ter cautela com o aumento da toxicidade ⁽³⁵⁾.

1.6. O receptor aril de hidrocarbonetos – AhR

1.6.1. O receptor: genética e evolução

O receptor aril de hidrocarbonetos (AhR) encontra-se presente somente a partir dos metazoários ocorrendo em vários filos. A presença de homólogos de AhR em três filos de invertebrados, nematoides, artrópodes e moluscos, sugere que o AhR esteve presente nos primeiros metazoários bilaterais. Esses resultados sugerem a presença de um antepassado comum entre estes grupos que viveram há 970 milhões de anos. Desta forma, antes do primeiro cordado, aproximadamente há 550 milhões de anos, existia um AhR. A caracterização da homologia entre os AhR revela características compartilhadas que podem nos levar a pensar na ancestralidade da função do receptor nos processos biológicos ⁽³⁷⁾. Esta organização pode ser vista na tabela 1.

Tabela 1 - Multiplicidade e a distribuição filogenética das várias formas de AhR

Taxon	Representante do gênero	Nome comum	protoAHR	AHR	AHR1	AHR2	AHR3	AHR4
Porifera	<i>Amphimedon</i>	sponge	-					
Placozoans	<i>Trichoplax</i>		+					
Cnidarians	<i>Nematostella</i>	sea anemone	+ (2)					
Arthropod	<i>Drosophila</i>	fruit fly	+					
Nematode	<i>Caenorhabditis</i>	worm	+					
Mollusc	<i>Mya</i>	clam	+					
Echinoderm	<i>Strongylocentrotus</i>	sea urchin	+ (2)					
Cephalochordate	<i>Branchiostoma</i>	amphioxus	+					
Urochordate	<i>Ciona</i>	sea squirt	+					
Jawless fishes	<i>Petromyzon</i> <i>Lethenteron</i>	lamprey		+ (5)				
Holocephalan	<i>Callorhynchus</i>	elephant shark		+		+	+(2)*	+
Elasmobranch	<i>Squalus</i>	spiny dogfish		+	+	+	+	?
Chondrosteian	<i>Acipenser</i>	sturgeon		+		+		?
Holosteian	<i>Lepisosteus</i>	gar		+		+	++	+
Teleost	<i>Fundulus, Oryzias</i>	killifish, medaka			+ (2)	+ (2)		+
	<i>Danio</i>	zebrafish		+	+	+		+ (2)
Lobe-finned fishes	<i>Latimeria</i>	Coelacanth		+	+	+	++	+
Amphibian	<i>Xenopus</i>	frog		+				+
Reptile	<i>Alligator</i>	alligator		+	+	+		+
Bird	<i>Gallus</i>	chicken		+	+	+		+
Monotreme	<i>Ornithorhynchus</i>	platypus		+		+		+
Marsupial	<i>Monodelphis</i>	opossum		+	+	+		+
Eutherian mammals	<i>Mus</i>	mouse		+				+
	<i>Felis, Panthera</i>	cat, tiger		+		+		+
	<i>Bos</i>	cow		+		+		+
	<i>Loxodonta</i>	elephant		+		+		+
	<i>Equus</i>	horse		+		+		+
	<i>Chlorocebus, Calithrix</i> <i>Homo, Gorilla</i>	green monkey, marmoset human, gorilla		+		+		+

Adaptado de Hahn (2017) ⁽³⁸⁾.

Considerando a história evolucionária do AhR, a partir de um único gene no primeiro cordado são identificados pelo menos três genes homólogos em espécies de vertebrados existentes ⁽³⁷⁾. Muitos animais contêm apenas uma isoforma, contudo, dois genes parálogos derivados de uma duplicação *in tandem* ⁽³⁸⁾, AhR1 e AhR2, são identificados antes da divisão em linhagens de peixes ósseos e cartilagosos ⁽³⁷⁻⁴⁰⁾. Ainda estes genes estão presentes em répteis, aves e mamíferos marsupiais. O AhR3 foi, de modo recente, encontrado restrito a uma subclasse de peixes cartilagosos que compreende as raias e verdadeiros tubarões. Usa-se AhR para se referir a vertebrados ortólogos do AhR originalmente identificados em mamíferos ⁽³⁸⁾.

1.6.2. Estrutura da proteína

O AhR humano é codificado por 11 éxons contidos no cromossomo 7 do genoma. Este gene codifica uma proteína de 848 aminoácidos de peso molecular de 96 kDa. O AhR é membro de uma superfamília de fatores de transcrição que têm dois motivos estruturais, o básico-hélice-alça-hélice (bHLH) e o PER-ARNT-SIM (PAS) ⁽⁴¹⁾.

O AhR apresenta na região N terminal do domínio bHLH um sinal de localização nuclear (NLS). O domínio é necessário para dimerização com DNA e proteínas. Consiste em uma região conservada de aminoácidos que compõem duas α -hélices anfipáticas separadas por um *loop* relativamente não conservado e uma região adjacente composta por aminoácidos básicos. A estrutura tridimensional do receptor encontra-se na figura 4a. O domínio PAS, localizado próximo a região C terminal do domínio bHLH, além de abrigar um sinal de exportação nuclear (NES), engloba aproximadamente 250-300 aminoácidos subdivididos nas regiões de PAS A e PAS B de 50 aminoácidos para cada. A região PAS participa como um local de ancoragem para outras proteínas PAS. Ainda, em seu domínio PAS B encontramos o motivo *LXCXE*, onde há sítio para a ligação da proteína retinoblastoma, reguladora do ciclo celular (pRb - proteína associada ao retinoblastoma). Já a região C terminal de AhR contém domínios de transativação (TAD), ricos em glutamina, que interage com vários co-ativadores transcrpcionais sendo, portanto, indispensáveis para a ativação de alvos gênicos. A figura que representa linearmente a estrutura de AhR encontra-se na figura 4b ⁽⁴¹⁾.

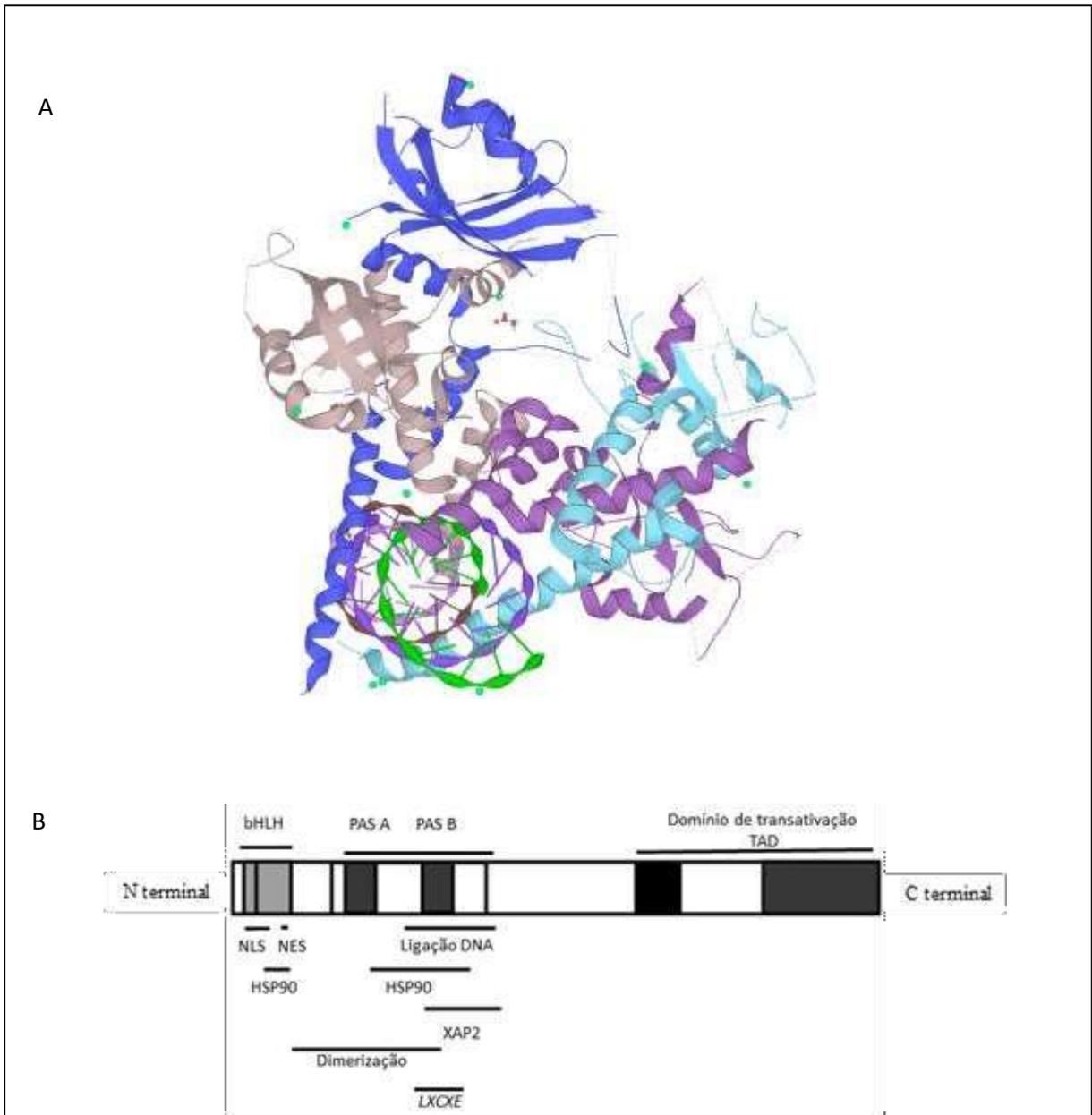


Figura 4 - Representação da estrutura do receptor aril de hidrocarbonetos. Em a: estrutura tridimensional de AhR humano feita pelo método de difração de raio-X, resolução 3,30 Å. De azul escuro a fita beta; a parte em espiral representa as estruturas de α -hélice (roxo) e as hélices (verde). (Imagem retirada de <https://www.uniprot.org/uniprot/P35869>). Em b: na região N terminal encontram-se os domínios bHLH, PAS A e B, os sinais de localização (NLS) e exportação nuclear (NES), a região para a ligação ao DNA e as proteínas HSP90, XAP2, ligante (dimerização) e pRb (domínio LXCXE). Na região C terminal o domínio de transativação (TAD) que interage com vários reguladores transcricionais e é indispensável a ativação de genes alvo. Imagem adaptada de ^(41,42).

Em seu estado latente, o receptor encontra-se estável no citoplasma associado a duas proteínas HSP90 (proteína choque térmico 90), e as demais co-

chaperona p23 (proteína p23) e a proteína de interceptação de AhR tipo imunofilina (AIP; também conhecida como XAP2 ou Ara9) e ainda se encontra ligado a este complexo a proteína tirosina quinase C-SRC (C-SRC). As duas moléculas de HSP90 disfarçam os sítios de ligação ao ligante e a região NLS no domínio bHLH ⁽⁴¹⁾, estando então diretamente envolvida na retenção do AhR no citoplasma ⁽⁴³⁾. A proteína AIP impede a ubiquitinação e consequente degradação de AhR. A co-chaperona p23 interage diretamente com a HSP90 e desempenha um papel importante na capacidade de resposta do ligante e no processo de ativação do receptor ⁽⁴¹⁾.

Os membros da família bHLH/PAS podem ser divididos na classe I e classe II. Os integrantes da classe I, como o AhR e o AhRR (repressor de AhR) e o grupo HIF (fator induzido de hipóxia) não se dimeriza com outros fatores da mesma classe, como pode acontecer entre a classe II. Estas proteínas da classe I precisam dimerizar com proteínas da classe II. O melhor exemplo caracterizado para esta ligação classe I com classe II seria a ligação do AhR com o ARNT (translocador nuclear do receptor aril de hidrocarbonetos) para formar complexos de transcrição ativos ⁽⁴³⁾. Os principais domínios estruturais do AhR, AhRR e ARNT são mostrados na figura 5.

O AhRR é transcricionalmente induzido via ativação dependente de AhR através de sequências responsivas encontradas no promotor do gene do repressor. O AhR e o AhRR compartilham alto grau de identidade de sequência nos domínios bHLH e PAS-A em contraste com o domínio PAS-B, porção que corresponde a ligação com o ligante, onde são bastante diferentes ⁽³⁷⁾. Desta forma, o AhRR não se liga aos ligantes comuns de AhR ^(37,38). O AhRR atua como regulador negativo da função do receptor, competindo com o AhR pelo ARNT disponível através da formação do complexo AhRR-ARNT, que liga aos elementos responsivos a AhR. O complexo AhRR-ARNT é transcricionalmente inativo ⁽³⁹⁾.

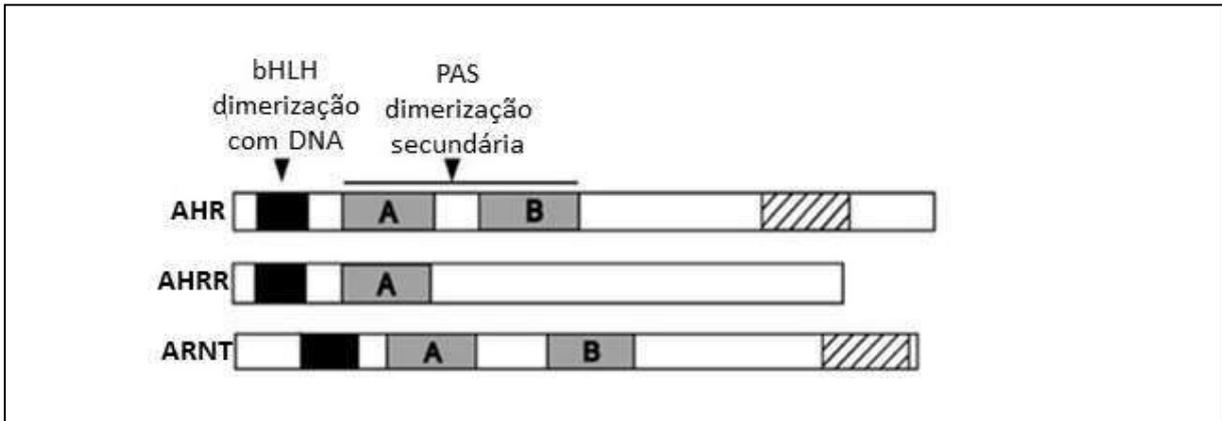


Figura 5 - Representação esquemática dos domínios de AhR, AhRR e ARNT. Em ▼ estão representados os domínios bHLH e PAS A e B. Em bHLH ocorre a dimerização ao DNA, importante para o controle gênico, e nos domínios PAS, subdividido em PAS A e B responsáveis pela interação com outras proteínas. Adaptado de ⁽⁴³⁾.

1.6.3. O receptor e seus ligantes

1.6.3.1. Ativação, translocação nuclear e degradação proteica

A ligação de uma molécula de alta afinidade ao receptor provoca mudanças em sua estrutura, levando-o a uma forma ativada e a dissociação de proteínas antes associadas ao receptor ⁽⁴⁴⁾. Durante esta etapa, a c-SRC é liberada no citoplasma e assim pode estimular outras rotas via fosforilação de receptores de membrana, primeiro passo na via de ativação de AhR não genômica ⁽⁴¹⁾.

Uma vez que haja a associação ao ligante, o receptor torna-se ativo e o sítio NLS fica exposto, assim o AhR é rapidamente translocado para o núcleo. Este processo pode ser dependente de fosforilação e desfosforilação de resíduos de serina dentro do sítio NLS ⁽⁴¹⁾. Uma vez no núcleo, o complexo HSP90 é trocado por ARNT ⁽⁴³⁾. O ARNT atua como parceiro comum para membros da família bHLH/PAS ^(41,43). A formação do heterodímero requer apenas a fosforilação de ARNT, mas a ligação do complexo AhR/ARNT ao DNA requer a fosforilação de ambas as proteínas especialmente em resíduos de tirosina ⁽⁴⁵⁾.

O complexo ligante-AhR em associação com a proteína ARNT (translocador nuclear de AhR) translocado para o núcleo e provavelmente junto com outros fatores, é capaz de se ligar em grande afinidade a determinadas sequências de DNA ⁽⁴⁴⁾. O heterodímero AhR/ARNT é transcricionalmente ativo e pode se ligar a motivos XRE (elementos responsivos a xenobióticos), contendo a sequência 5'-GCGTG-3' no promotor de regiões de genes alvos ⁽⁴¹⁾.

AhR e ARNT interagem com várias outras proteínas nucleares como fatores de transcrição basal, proteínas co-ativadoras e repressoras, proteínas de outras vias (por exemplo NF- κ B (fator nuclear *kappa* B), pRb) e outros receptores. A ligação do heterodímero com outros fatores de transcrição e co-ativadores proteicos facilitam a ativação de genes pelo complexo ⁽⁴⁵⁾. O processo de transativação acontece com a participação de vários co-ativadores que funcionam como remodeladores, atuam na dissociação de nucleossomos e ainda no recrutamento basal de fatores de transcrição e da RNA polimerase II na região promotora ⁽⁴⁶⁾.

No processo de sinalização de AhR a proteína AhRR exerce papel fundamental. Como dito anteriormente é uma proteína fortemente relacionada ao receptor. Já que contém alta similaridade com parte da porção N-terminal do receptor, é capaz de se juntar com ARNT e ligar a regiões XREs. Esta ligação do AhRR ao DNA recruta outras proteínas repressoras, especialmente histonas deacetilases, que modificam a estrutura da cromatina para mais condensada, inviabilizando a transcrição antes ativa ⁽⁴¹⁾.

Após a ligação a vários ligantes o AhR é reduzido significativamente ⁽⁴⁷⁾. O tempo de meia vida do receptor estável no citoplasma é cerca de 28 horas, e uma vez ativado, o complexo AhR-ligante tem o tempo reduzido para 3 horas. A degradação celular de proteínas pode ser feita através de sistemas proteolíticos, como o proteassoma 26S ou calpaínas ⁽⁴⁸⁾. No caso do receptor aril, a redução do nível proteico se dá através das vias proteassomais, procedente do processo de ubiquitinação ^(47,48). A degradação do receptor ocorre no citoplasma após a exportação nuclear ⁽⁴⁷⁾, processo que acontece pela fosforilação e desfosforilação em serina 68 na região NES ⁽⁴¹⁾.

A relação das proteínas acopladas ao AhR estável no citoplasma, HSP90 e AIP são importantes no processo de degradação já que se sobrepõem a sítios responsáveis pela estabilidade, importação e exportação nuclear, fosforilação e ubiquitinação, que leva ao reconhecimento pelo proteassoma 26S ⁽⁴⁷⁾. No processo de degradação, há a participação importante do domínio TA. De forma que, o TA serve como um *degron*, para o reconhecimento das enzimas E2 (enzima conjugada a ubiquitina E2) sozinha ou conjugada com ubiquitina ligase - E3 ⁽⁴⁸⁾. Todo o processo descrito acima é mostrado na figura 6.

Porém, uma vez que não há degradação da proteína, grandes quantidades de AhR no núcleo mantém altos índices de AhR-ARNT ligados ao DNA e de indução de

genes controlados por este complexo ⁽⁴⁷⁾.

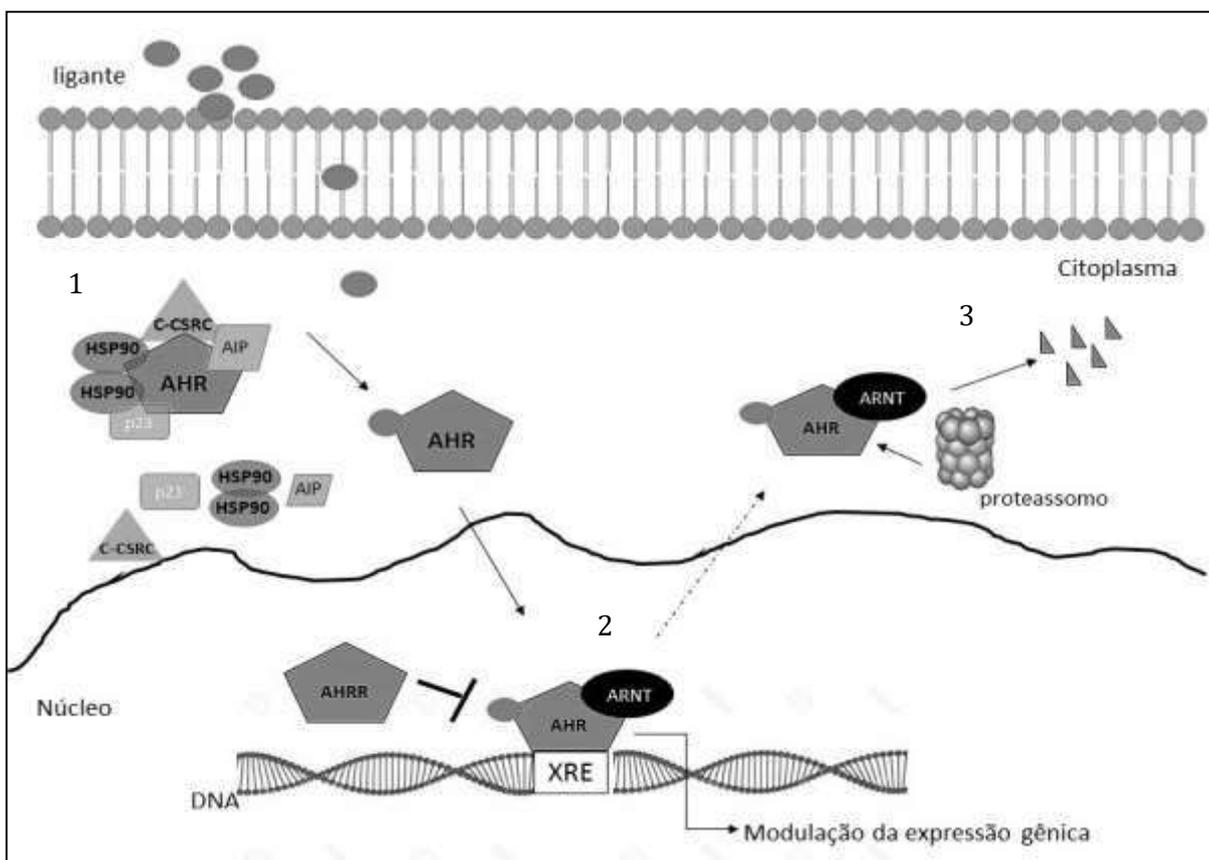


Figura 6 - Representação esquemática das interações de AhR após associação do ligante. Em 1 - Em estado latente o AhR reside no citoplasma associado às proteínas HSP90, p23, c-SRC e AIP. Uma vez ativado pelo ligante, o receptor dissocia-se dessas proteínas e é translocado para o núcleo. Em 2 - Acoplado a ARNT, o receptor se liga a sequências consenso responsivas a xenobióticos (XRE) e manipula a transcrição de genes alvos. Em 3 - Pós-ativação de AhR seguida de degradação proteossomal.

1.6.4. Os ligantes de AhR

Estudos em relação à estrutura-atividade dos compostos têm classificado os ligantes e indutores de AhR em clássicos e não clássicos, de forma que os ligantes clássicos compartilham das mesmas características físico-químicas. Dentre os ligantes clássicos estão listados o TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), benzopireno e outros hidrocarbonetos aromáticos cíclicos (PAHs) e halogenados (HAH). Já os indóis e flavonas, e as aminas heterocíclicas podem ser consideradas ligantes não clássicos naturais e sintéticos do receptor ⁽⁴⁴⁾.

Os compostos mais onipresentes e mais bem estudados são o triptofano e seus metabólitos, como 6-formilindol- (3,2-b) -carbazol (FICZ) e o ácido metil éster 2-

(1'H-indol-3'-carbonil) -tiazol-4-carboxílico (ITE) ⁽⁴⁹⁾. Dentre as moléculas contendo o grupamento indol pode-se destacar vários dos subprodutos do triptofano ^(44,50-52). Moléculas como triptamina e ácido indol acético são conhecidos ligantes de AhR, de forma que a triptamina age como antagonista de AhR, inibindo *cyp1a1* (membro 1 da subfamília 1 da família do citocromo P450) e favorecendo a regulação negativa do receptor ⁽⁵⁰⁾.

A quinurenina, também metabólito derivado da bioquímica do triptofano, é um dos ligantes de AhR e esta interação é bastante importante em processos do sistema imune, como a imunossupressão. Ainda ao longo da rota das quinureninas, uma das vias de metabolização do triptofano, pode-se citar o ácido quinurênico, ácido xanturênico como ligantes de AhR e desencadeadores de processos biológicos ^(53,54).

A ligação do ligante ao receptor desencadeia a cascata de reações descritas na seção anterior. Sabendo disso, estes diversos ligantes endógenos e exógenos podem conduzir múltiplos eventos da fisiopatologia mediados pela participação de AhR.

1.6.5. Os alvos de AhR e suas respostas biológicas

Apesar da quantidade de ligantes de AhR para muitos deles ainda não está descrita sua função fisiológica. Entretanto, a expressão constitutiva do receptor em vários tecidos, tipos celulares e linhagens celulares derivadas de tumores ⁽⁴¹⁾, além da alta conservação do receptor entre espécies, sugerem grande participação desta proteína na fisiologia celular e em vias patofisiológicas ⁽⁵⁵⁾. Deficiências no desenvolvimento, fertilização, reprodução, sistemas endócrino, nervoso e imunológico, bem como em processos carcinogênicos são algumas das respostas tóxicas mediadas pelo receptor estimulado por dioxinas ⁽⁴⁹⁾.

O modelo de alvo gênico mais estudado para o AhR são as enzimas da família 1 do citocromo P450 (450 1A1, 1A2 e 1B1) codificadas pelos genes *cyp1a*, *cyp1b* e *cyp1c* ^(44,56,57). Estas enzimas são capazes de metabolizar inúmeros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e aminas presentes no ambiente e alguns compostos carcinogênicos ⁽⁵⁸⁾. Além disso, existem trabalhos que apontam a relação de componentes desta família de enzimas com estresse oxidativo com o risco de câncer causado por hidrocarbonetos halogenados policíclicos ⁽⁵⁶⁾ ou por

componentes químicos do fumo de tabaco, por exemplo ⁽⁵⁹⁾.

O AhR é um importante regulador do desenvolvimento e função de células do sistema imunológico inato e adaptativo. O AhR é expresso em células do sistema imunológico, tais como linfócitos B e T, células dendríticas, macrófagos e células *natural killer*. Muitos genes envolvidos na regulação imune contêm vários elementos responsivos à dioxina ou xenobióticos nas regiões promotoras ⁽⁶⁰⁾, incluindo genes codificantes de todos os receptores *Toll-like*, IL-6 (interleucina 6) e TNF- α (fator de necrose tumoral α), por exemplo ⁽⁶¹⁾. Muitos genes codificadores de citocinas efetoras de células T regulatórias (Tregs), Th17 (células *T helper* 17) ou células linfóides inatas contêm em seus promotores sequências responsivas a ligantes do AhR ^(49,62). O AhR apresenta papel importante no desenvolvimento de células Th17 ⁽⁶³⁾, um grupo distinto de células T que tem papel importante na autoimunidade e no combate ou a tolerância imunológica a agentes infecciosos ^(61,64,65).

Ainda, vários estudos têm demonstrado a interação de AhR nos processos inflamatórios, proliferação celular, migração celular, apoptose e progressão do câncer ^(66,67,68).

1.6.6. Outras vias de sinalização de AhR: via não-genômica

Uma vez que o ligante se liga ao receptor, uma cascata de modificações estruturais, como mudanças conformacionais e dissociação de cofatores, ocorrem no complexo estável AhR-proteínas no citoplasma. Neste momento, a proteína quinase c-SRC, antes associada ao complexo, é liberada e pode estimular outras proteínas de vias de sinalização celular através da fosforilação de receptores de membrana. Esta cascata de eventos é considerada como a via não genômica de AhR ⁽⁴¹⁾. Desta forma, a c-SRC liberada, pode ativar e subsequente fosforilar proteínas parceiras. Uma destas proteínas, por exemplo a FAK (proteína quinase de adesão focal), está envolvida em processos de plasticidade celular através de eventos não-transcricionais que podem atuar conjuntamente com a regulação transcricional de genes envolvidos na migração celular. Assim, a ativação de AhR e da via não-genômica do receptor pode mediar processos biológicos importantes, como a migração e invasão de vários tipos celulares ⁽⁶⁹⁾.

A proteína c-SRC (tirosina quinase c-SRC) é codificada pelo oncogene *c-src* (proteína não-receptor tirosina quinase celular SRC). A transformação celular mediada por C-SRC

resulta de amplas mudanças fenotípicas, que incluem a transformação morfológica, o aumento da migração celular ou invasão, e tumorigenicidade ⁽⁷⁰⁾.

1.7. Metabolismo do triptofano

O triptofano é um aminoácido essencial e menos de 1% de sua metabolização é direcionada para a síntese proteica ^(71,72). A maioria do triptofano ingerido é direcionada para a produção dos metabólitos que tem ação fisiológica importante. Cerca de 80-90% do triptofano é direcionado a rota conhecida como via das quinureninas ^(72,73).

1.7.1. Via das quinureninas

A degradação do triptofano na rota das quinureninas se dá por sete passos, iniciando pela ação de duas enzimas, a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e a triptofano 2,3-dioxigenase (TDO). Normalmente a TDO é expressa no fígado e é responsável por regular a homeostase de triptofano no soro. A IDO pode ser expressa em vários locais, incluindo no sistema nervoso central, placenta, pulmão, intestino ou ainda células do sistema imune. A enzima é induzida por interferon gama (IFN- γ), interleucinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) associadas com condições patológicas, como infecção, câncer e até mesmo gravidez ⁽⁷²⁾. A rota das quinureninas pode ser observada na figura 7.

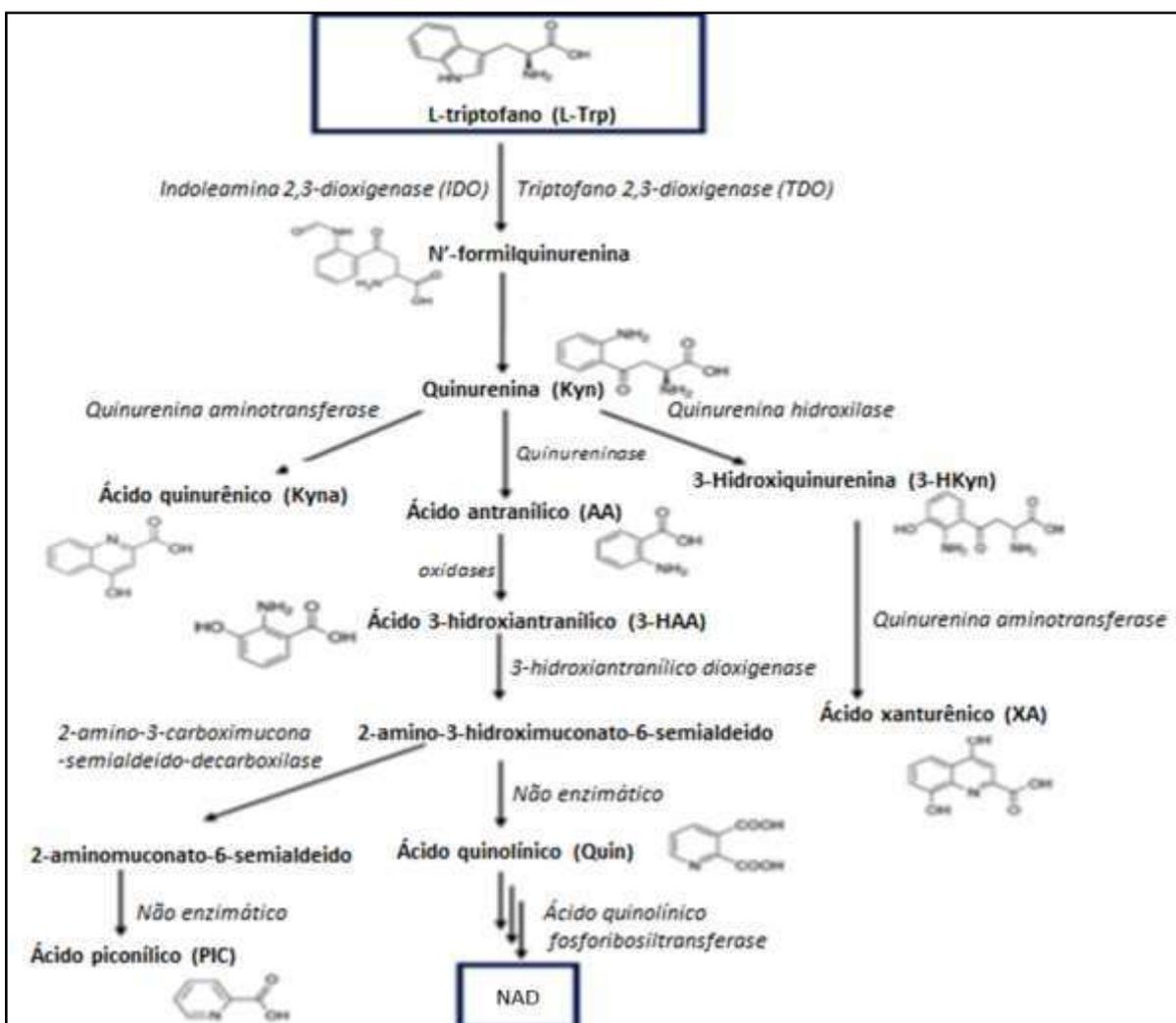


Figura 7 - Esquema do metabolismo do triptofano pela via das quinureninas. Em desEu sou da Faculdade de Farmácia, programa de Fisiopatologia e Toxicologia. Numero USP: 7941927.taque (caixas pretas) o aminoácido triptofano e o produto dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD) resultante dessa via de metabolização. Adaptado de Sadok et al (2017) ⁽⁷²⁾.

O primeiro passo da via da quinureninas é a oxidação do triptofano pelas enzimas IDO e TDO a N'-formilquinurenina que é rapidamente convertida a quinureninas. A quinureninas é metabolizada pela quinureninas aminotransferase (KAT I e KAT II) levando a formação de ácido quinurênico (Kyna) através de uma transaminação irreversível. A quinurenina, sob ação da quinureninas hidroxilase também pode ser precursora de 3-hidroxiquinurenina (3HKyn) ou pela ação da enzima quinureninas, formando ácido antranílico (AA). Em seguida, o AA é a base para a formação do ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA). Durante a depleção de 3HAA, há a geração de 2-amino-3-carboximuconato-6-semialdeído, que é metabolizado a

ácido picolínico (PIC) pela 2-amino-3 carboximuconato-semialdeído ou sob espontânea ciclização em ácido quinolínico (Quin). Este Quin é base para a formação ácido nicotínico, precursor de NAD (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) ⁽⁷²⁾.

1.7.2. Via serotoninérgica

Entre 1 a 2% de L-triptofano é metabolizado pela via serotoninérgica ^(72,73). A via serotoninérgica está apresentada abaixo na figura 8.

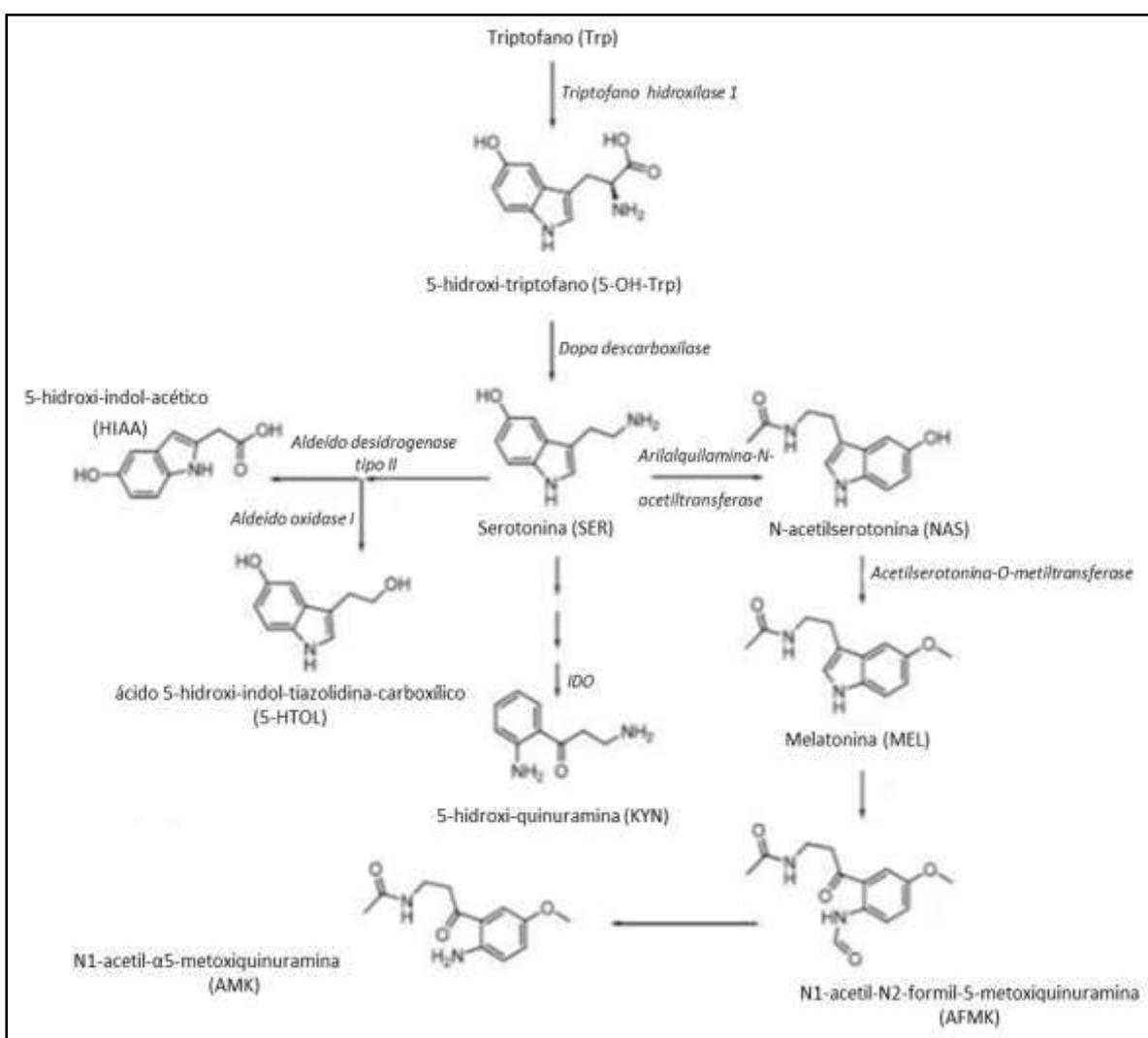


Figura 8 - Via serotoninérgica e seus metabólitos. Adaptado de Silva, M.B.B (2017) ⁽⁷⁶⁾.

Esta via de metabolismo do triptofano tem como fator limitante a primeira reação catalisada pela triptofano-5-monooxigenase ou hidroxilase. O L-triptofano é hidroxilado a 5-hidroxitriptofano (5-OH-Trp) na primeira etapa da reação ^(74,75). A

formação da serotonina (SER) ocorre pela descarboxilação do 5-OH-Trp, pela ação da dopa descarboxilase.

1.7.3. Via das aminas-traço

O triptofano pode ser metabolizado pela via das triptaminas (figura 9) através da ação da enzima aminoácido aromático descarboxilase, que em uma reação de descarboxilação tem a formação da triptamina. Em seguida, a triptamina sofre uma dupla metilação pela S-adenosil-metionina (SAM) por uma reação catalisada pela enzima indoletilamina-N-metil-transferase, gerando a dimetiltriptamina.

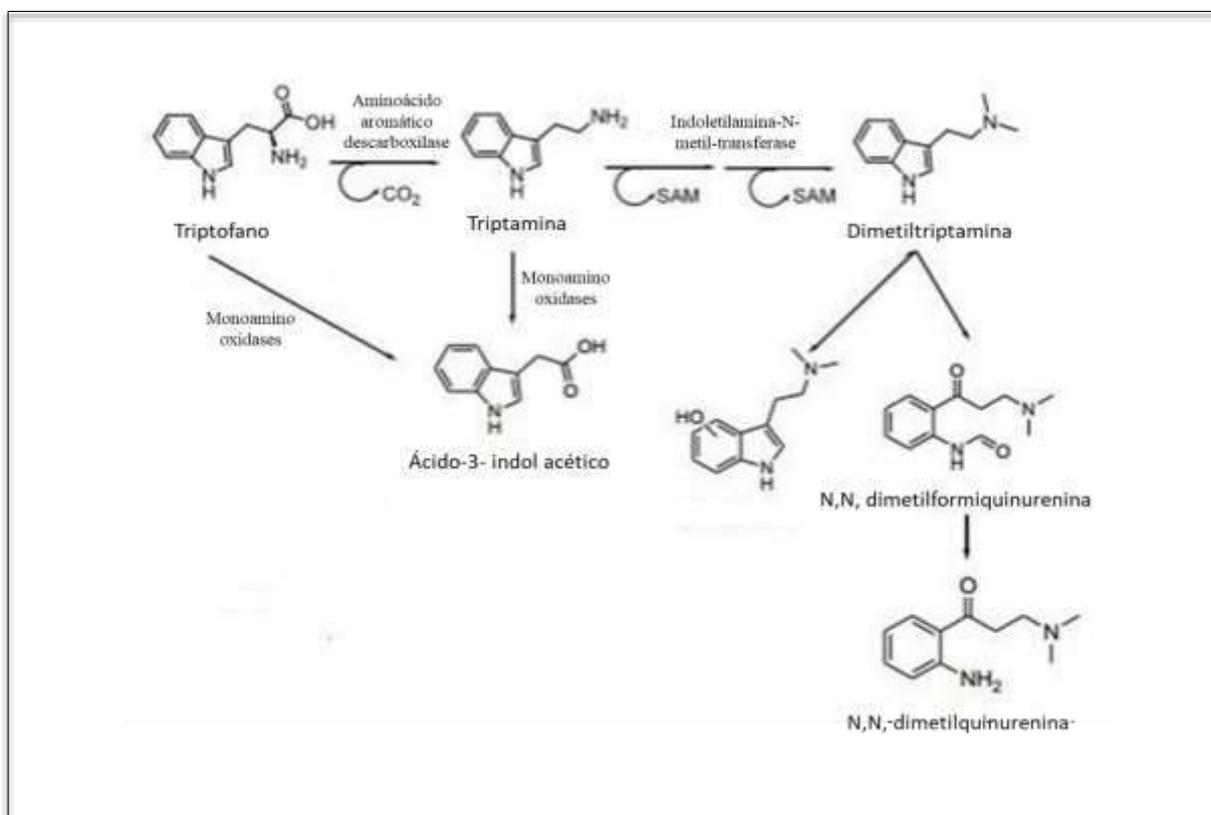


Figura 9 – Metabolismo do triptofano através da rota das triptaminas. Adaptado de Silva, M.B.B (2017)⁽⁷⁶⁾.

Ainda por ação de monoaminas oxidase pode haver a formação do ácido-3-indol acético. A dimetiltriptamina pode ser ainda hidroxilada por mieloperoxidases e peroxidases que levam a abertura do anel indólico, formando N,N, dimetilformiquinurenina e N,N, dimetilquinurenina ⁽⁷⁶⁾.

1.7.4. O mundo alucinógeno das triptaminas

Desde o início do século XX, foram sintetizadas em laboratório mais de 300 substâncias psicoativas que pertencem várias classes, dentre as quais, a classe das triptaminas. Pouco se sabe sobre a maioria destas substâncias derivadas da triptamina, as quais são pouco utilizadas em estudos em animais e humanos, levando a um desconhecimento sob seus efeitos em longo prazo ou potencial e riscos toxicológicos ⁽⁷¹⁾.

Historicamente, a humanidade vem usando substâncias psicoativas, como por exemplo, a “Ayahuasca” que é uma bebida composta basicamente pela planta *Banisteriopsis caapi* sozinha ou combinada com outras, como a *Psychotria viridis*. A primeira é a principal fonte de alcalóides β -carbonílicos, harmina, harmalina e tetrahydroharmina (THH) e, a segunda rica em DMT (N,N-dimetiltriptamina) ⁽⁷⁷⁾. Povos indígenas da Amazônia usam a combinação destas plantas a mais de 3000 anos, em rituais de iniciação, comunicação com os espíritos e experiências mágicas ⁽⁷⁸⁾.

O ritual de consumo do chá de ayahuasca, faz com que os participantes apresentem alterações do estado de consciência com função recreacional, religiosa ou terapêutica. Algumas sociedades religiosas como Santo Daime e União do vegetal fazem uso regular do chá em suas cerimônias ⁽⁷⁹⁾.

A ayahuasca tem sido empregada amplamente no que se diz respeito a religiões e cura. Mas também existem grupos que estudam as propriedades da bebida para fins psicoterapêuticos ⁽⁷⁸⁾. Têm-se empregado o chá na psiquiatria. Por exemplo, efeitos antidepressivos foram relatados com o uso da ayahuasca. Ainda, evidências sugerem efeito também em casos de estresse pós-traumático ⁽⁸⁰⁾.

1.7.4.1. N,N-Dimetiltriptamina (DMT)

A N,N-dimetiltriptamina (DMT) é um alcalóide indol encontrada na natureza. Comum em plantas e animais, no corpo humano é produzida em pequenas quantidades, podendo ser encontrado, nas formas, DMT, 5-metoxi-DMT (MDMT) e 5-hidroxi-DMT (HDMT), no líquido cerebrospinal (DMT e MDMT), no sangue e na urina (DMT e HDMT) ⁽⁷⁹⁾ e na glândula pineal ⁽⁸¹⁾.

Sua função endógena tem sido relacionada com efeitos psicoativos, como descrito primeiramente por Stephen Szára em 1956. Contudo, seus efeitos têm sido

explorados por anos sob uma perspectiva ritualística, pelos indígenas da América Central e do Sul (tal como no Brasil e Peru), em forma de ayahuasca ^(79,82).

Inicialmente introduzido em estudos científicos conduzidos no século XX, o DMT encontra-se associado a propriedades calmantes, como uso em baixas dosagens (menor que 0,2mg/kg) ⁽⁸²⁾. Ainda, o DMT pode ser relacionado a teorias sobre esquizofrenia ou em modelos de psicose ^(79,82).

1.7.4.1.1. A síntese de DMT

O DMT foi primeiramente sintetizado por Richard Manske, no Canadá em 1931, porém sem a descoberta de seus efeitos farmacológicos humanos. As propriedades alucinógenas só foram descobertas a partir de 1956, quando o químico e psiquiatra húngaro Stephen Szara extraiu DMT da planta *Mimosa hostilis* e administrou o extrato em si próprio intramuscularmente. Desses achados nos anos 50, relatou-se a serotonina e dopamina presente no cérebro humano. Outros novos compostos interessantes foram encontrados, mas os únicos alucinógenos conhecidos e isolados são derivados do triptofano ⁽⁸¹⁾.

O DMT pode ser sintetizado, através da triptamina, um dos metabólitos do triptofano ⁽⁸²⁾. A triptamina pertence a uma família de aminas-traço, naturalmente bioproduzidas da síntese ou do metabolismo de monoaminas precursoras ⁽⁷⁹⁾. Na biossíntese de DMT, a triptamina é metilada pela enzima indoletilanina-N-metiltransferase (INMT), que adiciona grupos metil resultando na produção de N-metiltriptamina (NMT) e uma segunda metilação produz o DMT (figura 10).

A enzima INMT é expressa em tecidos periféricos, tais como pulmões, tireóide, e glândula adrenal, ainda pode ser encontrada na retina, coração, músculo esquelético, estômago, linfonodos e placenta, por exemplo. Deve-se destacar que a localização de INMT não corresponde necessariamente a produção de DMT local. Dentro do cérebro humano, podemos encontrar INMT na medula, amígdala, córtex frontal, nos lobos temporal e frontoparietal ⁽⁷⁹⁾.

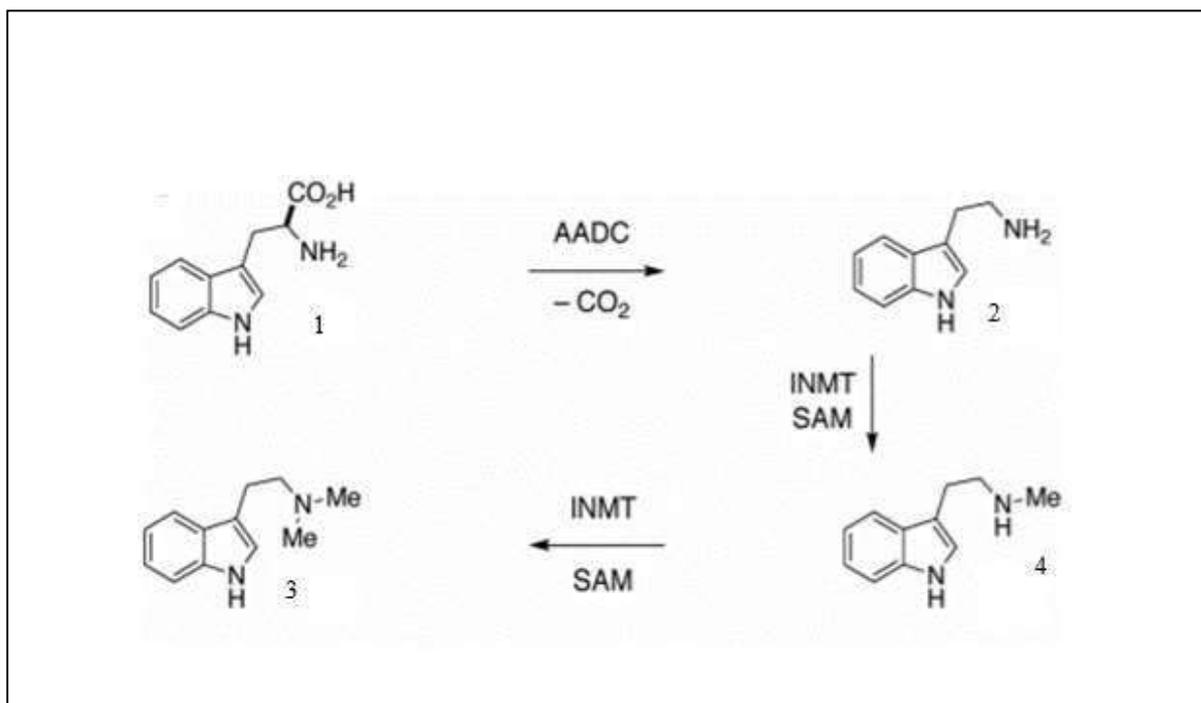


Figura 10 - Biossíntese de DMT. Na primeira linha, a reação de descarboxilação (-CO₂) do triptofano (1) produzindo triptamina (2) pela enzima L-Aminoácido aromático descarboxilase (AADC). Em seguida, a triptamina é metilada pela N-metiltransferase (INMT) com S-adenosilmetionina (SAM) doando grupo metil. Em seguida, segunda metilação catalisada por INMT de N-metilriptamina (4), com SAM, produzindo DMT (3). Adaptado de Camerom (2018) ⁽⁸²⁾.

1.7.4.1.2. O metabolismo de DMT

O DMT quando administrado de modo exógeno (intravenoso ou intramuscular) é metabolizado e eliminado na urina. A administração intravenosa de DMT confere um pico de concentração sanguínea dentro de 10-15 minutos, e fica abaixo dos limites de detecção dentro de uma hora. Devido a seu rápido metabolismo, o DMT não é oralmente ativo, sendo convertido a metabólitos inativos não chegando a atingir a região cerebral. O DMT só é oralmente ativo se for manejado juntamente com o inibidor da monoamino oxidase (MAOI). E farmacologicamente ativo se percorre vias que permitam o primeiro metabolismo no fígado, o que confere ser administrado intravenosa ou intramuscularmente ou fumado.

O metabolismo inicial é pela monoamino oxidase A (MAO-A) formando ácido indolacético (IAA), além de óxido-N-DMT (DMT-NO) e o N-metilriptamina (NMT) que junto com a triptamina é também substrato para a MAO-A, onde a partir de ambos produz IAA ⁽⁸¹⁾.

1.7.5. O metabolismo do triptofano e o câncer

Os níveis de triptofano são determinados de acordo com a dieta, e pelas atividades das rotas de metabolismo do aminoácido. A menor porção de triptofano é desencadeada para a síntese de proteínas e a produção de neurotransmissores e neuromoduladores, como a serotonina e triptamina, respectivamente. Acima de 95% do aminoácido livre é direcionado a rota das quinureninas com a produção de moléculas com atividade no sistema imune. Os níveis de triptofano e seus metabólitos são localizados em diferentes células e o desequilíbrio destes fatores está associado a uma lista de patologias que incluem depressão, esquizofrenia e câncer ⁽⁸⁵⁾.

1.7.5.1. Depleção de triptofano e o sistema imune: via das quinureninas

Durante o estabelecimento do tumor células malignas são capazes de escapar da ação do sistema imune. Neste contexto podemos destacar a importância da via das quinureninas e o papel das enzimas indoleamina-2,3 dioxigenase (IDO) e triptofano-2,3 dioxigenase na resposta imunomodulatória ⁽⁸⁶⁾.

A liberação da citocina pró-inflamatória, interferon- γ (INF- γ), induz a expressão e atividade de IDO. Já a TDO é induzida de acordo com a disponibilidade de triptofano na dieta, bem como tirosina, histidina e quinurenina ⁽⁸⁶⁾. A depleção de triptofano do meio, através da ação da enzima IDO, tem-se correlacionado com a supressão de proliferação das células T ⁽⁸⁶⁾ e sua função, bem como a indução da apoptose de células T ⁽⁸⁷⁾. Tanto a quinurenina quanto ácido picolínico, 3-hydroxiquinurenina (3-HK) e ácido antranílico (3-HAA) tem efeito imunossupressor ^(86,87).

A ativação de TDO, que catalisa a mesma reação como IDO, similarmente afeta a resposta imune pela inibição da proliferação de células T, restringindo o infiltrado imune tumoral e restringindo respostas imunes antitumorais. Quantidades extremas de triptofano ($<1 \mu\text{M}$) levam ao acúmulo de tRNAs (RNA transportador), que ativam a via da quinase GCN2, também conhecida como eIF2 α (fator iniciação eucariótico 2 α), que leva a disfunção de células T e células apresentadoras de antígeno (APCs). A supressão da resposta da célula T pela ação da enzima IDO promove a ativação ou diferenciação de células T reguladoras (T_{reg}) ⁽⁸⁵⁾.

Alguns estudos têm apontado quais os receptores celulares dos metabólitos do triptofano. Em destaque, o receptor aril de hidrocarbonetos que tem como ligante direto a quinurenina e os demais: triptamina, ácido quinurênico e o FICZ ⁽⁸⁷⁾, ácido xanturênico, ácido quinolínico e ainda ácido cinabaránico ⁽⁸⁵⁾. Assim como, a indução de células T_{reg} se dá pela ativação de AhR ⁽⁸⁵⁾. Neste contexto, a diferenciação da célula T auxiliar é dependente do ligante do receptor ⁽⁸⁷⁾. Uma vez que o AhR interage com o ligante e é ativado, em células CD4+ há a produção de interleucina 17 (células Th17) e em células T *naive* CD4 + há o controle de sua diferenciação.

Vários tumores têm aIDO expressa, com ou sem o estímulo de interferon. E a expressão de IDO pode ser correlacionada com um pobre prognóstico em diversos tumores ⁽⁸⁶⁾.

Considerando que o metabolismo do triptofano está correlacionado a progressão tumoral, encontramos aqui um excelente alvo de estudos e de intervenção terapêutica. Inibidores de IDO têm sido investigados na aplicação de imunoterapia, com vários *clinical trials*, em combinação com outras drogas inibidoras de pontos imunes importantes ⁽⁸⁵⁾. Vários esforços estão sendo empregados na resolução de novos inibidores eficientes do metabolismo do triptofano, que favorece as terapias convencionais empregadas em modelos pré-clínicos e clínicos. Ainda, o catabolismo do triptofano pode ser usado como um biomarcador de progressão da atividade da doença e como resposta às terapias empregadas ⁽⁸⁷⁾.

1.7.5.2. A via serotoninérgica e o câncer

Dentre os metabólitos da via serotoninérgica, podemos destacar a participação da melatonina e a serotonina em processos biológicos de destaque no quadro tumoral.

A melatonina é uma molécula endógena que participa na sinalização e ativação de várias vias, dentre as quais podemos destacar a ativação de p53, e a *downregulation* de PI3K/AKT/ERK, e NF-κB. A melatonina ainda pode desencadear fenótipos de proliferação celulares opostos em relação a sua concentração, podendo ser bastante dúbia as suas funções celulares. Estes resultados podem ser devidos a diferenças em protocolos de incubação e exposição, somado a diferenças epigenéticas, genéticas e fenotípicas de cada célula ⁽⁸⁸⁾.

De outra maneira, estudos realizados com os metabólitos da melatonina,

precursores de indóis, como a metoxitriptamina, ou produzidos durante o metabolismo celular como a 6-hidroximelatonina, mostraram diferentes eficácias na inibição da proliferação celular tumoral ⁽⁸⁸⁾.

No melanoma, a melatonina pode inibir e em alguns casos induz a citotoxicidade de linhagens celulares B16. Ainda, concentrações acima de milimolar de melatonina podem reduzir a viabilidade em células de melanoma B16 4A5, através da produção de espécies reativas de oxigênio que disparam a ativação de vias apoptóticas ⁽⁸⁸⁾.

Dependendo do tipo celular, do status redox, e outros fatores a melatonina pode ter ação pró-sobrevivência (em células normais) ou pró-apoptóticas (em células tumorais) ⁽⁸⁸⁾. Estratégias terapêuticas têm sido empregadas em combinação com a melatonina com indutores de estresse de retículo em linhagens de melanoma B16, resultando na supressão da sobrevivência celular através da regulação da via PI3K/AKT/mTOR ⁽⁸⁹⁾. Tendo em vista estas informações, o estudo da ação da melatonina em processos apoptóticos deve ser relevado ⁽⁸⁸⁾.

A serotonina participa de vários processos fisiológicos, como a contração de musculatura lisa, regulação da pressão sanguínea e periférica, atua como neurotransmissor do sistema nervoso central e ainda controla aspectos comportamentais ⁽⁹⁰⁾.

Alguns estudos mostram a participação da serotonina em casos de carcinoma, onde os pacientes apresentam alto nível de serotonina no sangue. Estes tumores carcinoides, que surgem de células do epitélio que revestem o intestino ou o trato respiratório, podem causar excesso de síntese, estoque e liberação de serotonina e outros compostos biológicos que levam a sintomas diarreia, lesões cardíacas, broncoconstrição e comportamento anormal ^(90,91).

1.7.5.3. A via das triptaminas e o câncer

Derivados da triptamina são considerados antitumorais devido a sua alta citotoxicidade ^(92,93). Compostos nitrogenados de fontes naturais têm-se mostrado eficientes contra alguns tipos celulares. Na literatura encontra-se o uso de triptaminas extraídas de organismos de água doce e salgada com efeito citotóxico em linhagens de câncer ^(94,95).

Poucos estudos têm relação ao emprego das triptaminas, derivadas do metabolismo do triptofano, na biologia tumoral. Trabalhos anteriores do grupo mostram que a via das triptaminas está ativa nas linhagens de melanoma SK-Mel147 e SK-Mel19. Nosso grupo mostrou que estas linhagens em contato com a triptamina e DMT apresentaram menor clonogenicidade, ou seja, menor número e área de colônias em relação ao controle. Ainda pôde-se observar uma maior morte celular e menor capacidade de invasão da linhagem SK-Mel19 tratada com triptamina (dados não publicados) ⁽⁹⁶⁾.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, poucos trabalhos têm revelado a inter-relação do receptor aril de hidrocarbonetos (AhR) e seus ligantes na biologia do melanoma e poucos discutem sobre a interação de AhR com alguns dos metabólitos do triptofano que não seja a quinurenina.

Nosso grupo tem se dedicado a caracterizar o papel dos metabólitos do triptofano em modelos de melanoma ⁽⁸³⁾. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram a ação antitumoral de metabólitos da via da triptaminas em linhagens de melanoma, de forma que dentre os metabólitos do triptofano vê-se que a quinurenina demonstra atividade pró-tumoral e que a triptamina (Try) e a dimetilriptamina (DMT) apresentaram ação antitumoral (dados não publicados). A partir disso, postulamos que o AhR pode participar de respostas distintas na biologia do melanoma se ativado por produtos do metabolismo do triptofano.

Associado a isto, tendo em vista sua história evolutiva com o alto grau de conservação entre as espécies, e a presença deste receptor em diferentes tipos celulares, tornam-no um objeto de destaque. Ainda, a presença de ampla variedade de ligantes e os diferentes efeitos mediados pela ativação de AhR, tanto de forma transcricional quanto através de uma rede de sinalização não-genômica, desencadeando várias respostas celulares, mostra uma complexa interação deste receptor na homeostase celular.

Com base nos tópicos abordados, estudos sobre AhR e seus ligantes no melanoma podem elucidar interações pouco compreendidas com a participação do receptor em processos tumorais.

3. OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho está baseado nas seguintes hipóteses: a primeira hipótese de que o receptor aril de hidrocarbonetos (AhR) pode estar associado às mutações NRAS e BRAF e com a resistência ao Vemurafenib. De forma que, se células resistentes exibirem maior expressão de AhR este receptor pode ser um possível marcador de resistência e uma questão a ser futuramente considerada no tratamento. A segunda hipótese é que o AhR pode ser um mediador de diferentes respostas tumorais de acordo com o ligante associado. De modo que compostos previamente descritos como antitumorais pelo nosso grupo, como a triptamina e dimetilriptamina, estariam relacionadas ao receptor. Para elucidar esta hipótese nosso objetivo é construir linhagem nocaute para AhR através da ferramenta de edição CRISPR-Cas9.

3.1. Objetivos específicos

1. Avaliar os níveis basais de expressão de AhR, mRNA em células de melanoma em um painel de linhagens mutadas para NRAS, BRAF, e BRAF resistentes ao Vemirafenib;
2. Construir linhagens de melanomas editados geneticamente para o receptor AhR pela ferramenta CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- associated protein-9 nuclease* (Cas9));
3. Avaliar a ligação de AhR e seu papel nos efeitos biológicos de metabólitos do triptofano sobre linhagem de melanoma SK-Mel147.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Células

4.1.1. Cultivo celular de melanomas parentais e resistentes

Os melanomas foram mantidos em meio DMEM (Meio de Eagle Modificado de Dulbecco) ou RPMI (*Roswell Park Memorial Institute* - Gibco – Life Technologies) suplementados com 10% ou 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina), respectivamente. As células resistentes ao Vemurafenib (PLX4032, RG7204) foram cultivadas na presença de PLX4032 em diferentes concentrações (tabela 2). As culturas foram mantidas a 37°C e 5%CO₂.

Tabela 2 – Concentração de Vemurafenib usada no cultivo de linhagens de melanoma resistentes.

Linhagem resistente	Concentração de Vemurafenib
A375	4,5 µM
SK-Mel19	3 µM
SK-Mel28	6 µM
SK-Mel29	6 µM
UACC62	6 µM
WM164	3 µM

As células utilizadas neste projeto são provenientes do banco de linhagens da professora Dr^a Silvyia Stuchi Maria-Engler (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-USP). As diferentes linhagens dos melanomas utilizados durante o desenvolvimento do projeto possuem diferentes mutações e estas estão listadas na tabela 3.

Tabela 3 - Listagem das células e suas mutações.

Linhagem	Origem	Perfil mutacional					
		KRAS	EGFR	NRAS	PTEN	PI3KCA	BRAF
A375	Metástase	WT*	WT	WT	N.R*	N.R	p.V600E*
A375 res	Metástase	WT	WT	WT	N.R	N.R	p.V600E
SK-MEL-19	Metástase			WT			p.V600E
<i>SK-MEL-19</i> <i>res.</i>	Metástase			WT			p.V600E
SK-MEL-28	Metástase			WT			p.V600E
<i>SK-MEL-28</i> <i>res.</i>	Metástase			WT			p.V600E
SK-MEL-29	Metástase			WT			p.V600E
<i>SK-MEL-29</i> <i>res.</i>	Metástase			WT			p.V600E
SK-MEL-103	Metástase			p.Q61R*			WT
SK-MEL-147	Metástase			p.Q61R			WT
SK-MEL-173	Metástase	N.R	N.R	p.Q61K*	N.R	N.R	N.R
UACC62	Metástase			WT			p.V600E
<i>UACC62 res.</i>	Metástase			WT			p.V600E
<i>UACC257</i>	Primário						p.V600E
WM793	Primário VGP*	WT	WT	WT	WT	N.R	p.V600E
WM164	Metástase						p.V600E
WM164 res	Metástase						p.V600E

* KRAS (homólogo oncogene viral de sarcoma de rato Kirsten), EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), NRAS (homólogo do oncogene viral de neuroblastoma RAS), PTEN (homólogo de fosfatase e tensina), PI3KCA (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, subunidade catalítica alfa), BRAF (homólogo B do oncogene viral do sarcoma murino v-Raf), WT (selvagem), N.R. (não registrado), p.V600E (substituição *missense* na posição 600, V-E), p.Q61R (substituição *missense* na posição 61, Q-R), p.Q61K (substituição *missense* na posição 61, Q-K), VGP (fase de crescimento vertical).

4.1.2. Células utilizadas para desenvolvimento da técnica de CRISPR-Cas9

Ainda as linhagens de melanoma submetidas ao protocolo CRISPR-Cas9 foram selecionadas positivamente para a edição gênica com puromicina (Gibco) a

10 mg/mL. O projeto foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da FCF, e encontra-se registrado sob o número 0342017.

As bactérias *E. coli* foram cultivadas a 37°C ou a 32°C (nos protocolos que tinham bactérias transformadas contendo o vetor lentiviral – clonagem bacteriana) em meio LB (Luria Bertani – Invitrogen), que consiste de 10 g peptona 140, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio. Para o preparo de meio sólido foi utilizado o meio LB Ágar (Invitrogen) de composição igual ao LB acrescido de 12 g de ágar. As bactérias *E. coli DH5α* transformadas receberam os vetores pPIC9K (Invitrogen), lentiCRISPRV2 (Addgene) e lentiCRISPRV2 com a sequência guia, p59, p60 e p61 (Tronolab), e foram selecionadas com o antibiótico ampicilina (Sigma Aldrich) a 100 µg/mL.

As células HEK293FT, cedidas gentilmente pelo Professor Dr. Carlos Frederico Martins Menck (Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo), foram cultivadas em meio DMEM *high-glucose* (Meio de Eagle Modificado de Dulbecco com alta glicose) com 10% SFB, 1% de GlutamaX 200 mM (Gibco TM), 1% de piruvato de sódio 100 mM (LGC Biotecnologia), 1% de *MEM non essential aa solution* (Gibco TM). As culturas foram mantidas a 37°C e 5%CO₂.

4.2. Extração de RNA total, obtenção de cDNA e qPCR

4.2.1. Extração de RNA total

As células de melanoma e melanócitos foram submetidas ao protocolo de extração de RNA total e produção de cDNA (DNA complementar). O ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído utilizando-se o *Kit RNeasy Plus Mini* (Qiagen, Hilden, Germany), segundo instruções do fabricante.

O RNA total, previamente aquecido a 65°C por 5 minutos, foi quantificado através do espectrofotômetro de luz ultravioleta a 260 nm (nanômetro) e sua qualidade foi verificada pelas relações A260/A280 e A260/A230.

4.2.2. Transcrição reversa (RT-PCR) e síntese de cDNA

Para a reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), foi utilizado o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse*

Transcription kit (ThermoFisher Scientific). Adicionou-se 2 µg de RNA total a 2 µL de RT Random primers, 2 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTP's (desoxirribonucleótidos fosfatados) a 100 mM, 1 µL de *Enzime Multiscribe* e 4,2 µL de água livre de nuclease.

O ciclo de reação consiste em incubar a mistura no termociclador a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e mantido a 4°C, e posterior armazenamento a -20°C até o uso. As amostras de cDNA não foram quantificadas, visto que o produto da reação continha, além de cDNA, diversos dNTPs, que poderiam indicar um falso positivo na quantificação. Portanto, considerou-se que todo o RNA mensageiro (mRNA) contido no RNA total inicial foi convertido em cDNA. Para uso na placa de Real-Time PCR, o cDNA utilizado foi diluído 20X na proporção de (1 µL para 19 µL).

4.2.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR

Para a reação de *real time* PCR foram utilizados *primers* dos genes de interesse AhR (Hs00907314_m1) e o gene endógeno GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) (Hs03929097_g1), ambos da Taqman®. O ensaio de Real Time PCR foi realizado no aparelho *Gene Amp 7500 Sequence Detection System v2.0.5* (PE - Applied Biosystems), localizado no Laboratório do Prof. Mário Hirata (Laboratório de Bioquímica Clínica, FCF – USP). A reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturaçãõ inicial a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos com desnaturaçãõ a 95°C por 15 segundos, associaçãõ dos *primers* e extensãõ a 60°C por 1 minuto. Os dados foram analisados utilizando-se o método de quantificaçãõ comparativa $2(-\Delta\Delta C(T))$ ⁽⁹⁷⁾. Os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas com triplicata experimental. As amostras foram comparadas a expressãõ encontrada no melanócito por ser a célula basal de desenvolvimento do tumor.

4.3. Western blotting

4.3.1. Extração de proteína total

As placas de cultura foram lavadas 2 vezes com PBS (Tampão fosfato-salino) 1X gelado, adicionado cuidadosamente. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tripsina por placa seguida de incubação por 2 minutos a temperatura ambiente. A tripsina foi inativada com 2 mL de meio DMEM com 10% SFB. Coletar as células soltas em

tubos falcon de 15 mL e centrifugar por 5 minutos a 1500 RPM a temperatura ambiente. Em seguida o *pellet* foi lavado 2 vezes com PBS 1X gelado e o sobrenadante foi cuidadosamente retirado. Adicionamos em seguida 100 µL de tampão RIPA contendo os inibidores de proteases (Roche) e fosfatases (Santa Cruz Biotechnology) (tabela 4) e homogeneizado em seguida. Além disso, o lisado celular foi passado através de uma seringa de insulina (1 mL) por 3 vezes ou até desfazer as granulações.

Tabela 4 - Tampão RIPA e inibidores de proteases utilizados na extração proteica.

Tampão RIPA	Tris-HCl 50 mM pH 7.5-8.0 NaCl 150 mM Triton X-100 1% (volume/volume) Deoxicolato de sódio 1% (peso/volume) Dodecil sulfato de sódio 01% (peso/volume) Água destilada q.s.p. 100 mL
Solução de inibidores (para 1mL de tampão RIPA)	Pepstatina a 1 mg/mL
	Leupetina a 1 mg/mL
	Aprotinina a 1 mg/mL
	NaOrthoVanadato 100 mM
	Inibidores de proteases (100 µL) e fosfatases (10 µL)

O lisado foi incubado em gelo por 10 minutos e depois centrifugado a 14000 RPM por 30 minutos a 4°C. A amostra foi mantida em gelo até a quantificação ou armazenada em -20°C ou 80°C até o uso.

4.3.2. Quantificação proteica

A concentração de proteína dos sobrenadantes foi determinada utilizando a curva de Bradford lida 595 nm. As amostras foram diluídas 20 vezes e submetidas ao leitor de placas Biotech.

4.3.3. Condições do gel, transferência e revelação

O protocolo descrito em seguida descreve as condições que foram padronizadas para o experimento de *western blotting*.

As amostras de proteínas (20 µg) foram diluídas em tampão de amostra e desnaturadas a 95°C durante 3 min e separadas por eletroforese em gel de acrilamida a 12%. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Invitrogen) de 1,5 mA/cm² durante 1 hora, em constante de 400 mA e 400 W a 100 Volts. Após bloqueio com 5% de leite desnatado (Molico) em (tampão tris salino) TBS-Tween 20 (50 mM de Tris-HCl pH 7,6, 150 mM de NaCl, 0,1% Tween-20), as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal de coelho anti-AHR (Abcam, ab190797) na diluição de 1:5000 em 5% de leite em TBS-Tween e o anticorpo secundário policlonal *anti-rabbit* (NA934V *anti-rabbit* IgG, *Horseradish Peroxidase linked whole antibody* - GEhealthcare UK Limited) em TBS-Tween. A membrana foi submetida a imunodeteção com ECL (Amersham Pharmacia Biotech) com o tempo de exposição variando de 3 a 10 minutos.

Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-Tween pH 7,6 e incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-beta actina (Abcam 8227) na concentração de 1:1000. Em seguida foi incubada com anticorpo secundário *anti-rabbit* na diluição de 1:3000. A membrana foi direcionada para a imunodeteção com ECL, com a variação do tempo de exposição de 3 a 5 segundos para visualização da proteína endógena.

4.4. Extração de DNA vetorial

A extração do vetor de bactéria foi realizada com o *Kit Pure Link TM HiPure plasmid Maxiprep* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

4.5. Clivagem de DNA vetorial

Amostras dos vetores foram digeridas utilizando-se as enzimas de restrição *BamHI*, *EcoRI* e *BmsBI*, de acordo com as instruções do fabricante (Fermentas Life Sciences).

4.6. Eletroforese em gel de agarose

Em cada amostra de DNA foi adicionado 1/10 de volume de tampão de amostra (0,25% azul de Bromofenol; 0,25% xileno cianol; 15% Ficol – tipo 400) e a amostra foi aplicada em gel de agarose de 0,8% a 1,5%, conforme a resolução necessária, em 1X TAE (2 M Tris-acetato e 3 M EDTA) e corada com *Gel Red Nucleic Acid Stain* (BIOTIUM). O fracionamento das moléculas foi feito com a aplicação de uma diferença de potencial de aproximadamente 7,7 volts/cm por tempo suficiente para que o corante bromofenol migrasse 2/3 do comprimento do gel. A visualização dos fragmentos foi feita com a incidência de luz ultravioleta e registrada em máquina fotográfica digital.

4.7. Determinação da sequência de nucleotídeos de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado no INCA (Instituto Nacional do Câncer), Rio de Janeiro a partir do protocolo de Sanger e Coulson, 1975 ⁽⁹⁸⁾. As sequências obtidas foram analisadas no software *BioEdit Sequence Alignment*©.

4.8. Desenhos das sequências guias, clonagem e construção de vetores

Os desenhos das sequências guias foram realizados em colaboração com a Dr^a Patrícia A. Possik (INCA). A construção do vetor, clonagem e transformação bacteriana e sequenciamento foram desenvolvidos no INCA em colaboração com a Dr^a Patrícia A. Possik.

As sequências guias de DNA foram desenhadas através da plataforma (<http://www.genome-engineering.org/>). Em seguida, a partir da avaliação das sequências guias emitidas pela plataforma, as sequências de DNA (oligos) melhores avaliadas foram desenhadas de acordo com as instruções contidas no protocolo (*Designing Guides for LentiCRISPRv2 and lentiGuide-Puro* – Addgene - <http://www.genome-engineering.org/>). Posteriormente, estas sequências foram submetidas a análise nos bancos de dados do *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) e *Ensembl* para conferir a complementaridade da sequência escolhida certamente ao gene AhR.

A parte inicial da clonagem que consiste na digestão do vetor e ligação do inserto foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante

(<http://www.genome-engineering.org/>) (*Target Guide Sequence Cloning Protocol*). Os vetores utilizados neste projeto são: pPIC9K (Invitrogen), como controle da transformação; lentiCRISPRv2 (Addgene), que contém o sítio de clonagem para o inserto de interesse; p59, p60 e p61, são os vetores *helpers* que contém informações para a formação da partícula viral. As ligações dos fragmentos de DNA foram feitas com T4DNA Ligase (New England Biolabs) de acordo com as recomendações do fabricante. A preparação de bactérias competentes foi feita com cloreto de cálcio conforme descrito por Sambrook (1989) ⁽⁹⁹⁾. A transformação bacteriana foi feita de acordo com as instruções do fabricante (<http://www.genome-engineering.org/>).

4.9. Protocolo CRISPR-Cas9

4.9.1. Transfecção lentiviral de células HEK 293FT

As soluções utilizadas foram: meio DMEM 10% SFB, solução 2x CaCl₂ (0,25 M) mantido a 4°C até o uso, solução 2x HBS (8,18 g NaCl, 5,95 g de HEPES, 0,13 g Na₂PO₄.2H₂O, com pH final entre 6.95/7.00/7.05). Em seguida, esta solução foi filtrada e mantida a 4°C. E a solução de cloroquina 25 nM foi preparada antes do uso. Foram utilizados os vetores *helpers* (p59, p60, p61), o vetor com proteína fluorescente e vetores lentiCRISPRV2 e lentiCRISPRV2-guia.

Em seguida foram seguidos os passos enumerados abaixo:

1. Dia 01

As células HEK293FT (4-4,5x10⁶ células – 80% confluência) foram plaqueadas em placas de 10 cm², sendo 2 placas com culturas que receberam a partícula lentiviral controle (lentiCRISPRV2) e a partícula lentiviral de interesse (contendo as sequências guias).

2. Dia 02

Os meios das culturas foram trocados, adicionando cuidadosamente 9 mL de DMEM 10% SFB com 10 µL de cloroquina 25 nM (10:1000). As células foram incubadas na estufa 37°C, 5% CO₂. O *mix* de DNA foi preparado em falcon de 15 mL contendo a solução A: 500 µL de 2x CaCl₂, o volume referente para pegar 3 µg de cada *helper*, o volume referente a 0,5 µg do vetor repórter. Adicionou-se 8 µg do vetor-guia e do vetor lentiCRISPRV2, nos respectivos tubos. O material foi vortexado

por 5 segundos com a solução A. Foi adicionado (gotejando) 500 µL de HBS no *mix* de DNA na solução A, ainda vortexando. Em seguida, borbulhamos o *mix* de DNA com pipeta sorológica (de 2 ou 5 mL) por 10 segundos e adicionamos o *mix* cuidadosamente e de forma homogênea por toda a placa de HEK293FT. As placas foram homogeneizadas suavemente e incubadas por 6 horas. Em seguida, o volume de meio DMEM foi trocado.

3. Dia 03

O meio das placas transfectadas foram trocados e as linhagens de melanoma plaqueadas (1 milhão de células, 30-50% confluência).

4. Dia 04

O meio foi coletado através de uma seringa de 10 mL e centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos. Em seguida, o volume coletado foi filtrado usando filtros de 0,45 µM na tentativa de pegar menos células possível. As placas que não se mostraram com 100% de confluência tiveram o meio trocado e no dia seguinte foi realizada mais uma coleta das partículas lentivirais. Este material coletado foi aliquoteado em tubo de congelamento com 1 mL do meio com a partícula lentiviral.

4.9.2. Infecção de células tumorais

As soluções usadas nesta etapa foram: meio DMEM 10% SFB, *polybrene* (Sigma Aldrich), solução de puromicina (concentração da solução mãe -10 mg/ml - Gibco).

5. Dia 01

Plaqueamento das células que receberão as partículas lentivirais.

6. Dia 02

As partículas lentivirais foram adicionadas às culturas alvo nas diluições de 1:3 ou 1:6 em meio DMEM (no volume total de 8 ml). Com o auxílio de uma seringa a titulação viral foi coletada e a esta foi adicionado *polybrene* (1:1000 - 8 µl em 8 mL). A seringa foi invertida por 3 vezes e então o conteúdo foi gotejado sobre a cultura de células a serem infectadas. Em seguida, as placas foram então incubadas *overnight*.

7. Dia 03

O meio das placas transfectadas foram trocados.

8. Dia 04

Iniciou-se a seleção das linhagens com o antibiótico. De acordo com a curva de puromicina (dados não mostrados) iniciamos com 0,5 µg/mL em cada placa de cultura.

4.10. Síntese de dimetiltriptamina (DMT)

A síntese de DMT foi realizada com suporte do técnico especialista Felipe Augusto Dörr e colaboração com a doutoranda Isadora Oliveira, no laboratório do professor Dr. Hélio Alexandre Stefani, da FCF-USP. A síntese que tem como produto o DMT em forma de sal (DMT-ácido fumárico (2:1)). Este protocolo de síntese foi escolhido por favorecer maior precisão no uso e na determinação da concentração do material conforme descrito em Cameron (2018) ⁽¹⁰⁰⁾.

Em uma solução de triptamina (0,50 g; 3.1 mmol) em metanol (49 mL) em gelo, foi adicionada a ácido acético glacial (0,89 mL; 15 mmol; 5 equiv) e cianoborohidreto de sódio (0,39 g; 6.2 mmol; 2 equiv). Em seguida, adicionou-se formaldeído (aq) 37% (0,66 mL; 8,1 mmol; 2.6 equiv). A reação foi realizada em temperatura ambiente por 5 horas antes de ser concentrada a pressão reduzida. O material não purificado foi diluído em 50 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) em 100 mL de 1 molar de NaOH (aq). As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída 2 vezes com 50 mL de diclorometano (CH₂Cl₂). À fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio (Na₂SO₄). Em seguida a solução foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material não purificado foi dissolvido em acetona (15 mL) e adicionou-se a uma solução em ebulição de ácido fumárico (0,26 g; 2.2 mmol; 0,7 equiv) em acetona (50 mL). O precipitado formou-se, e a solução foi resfriada à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi deixado em geladeira para melhor precipitação e rendimento, antes de ser filtrada. O sólido resultante foi seco em pressão reduzida para produzir o composto puro com o sal fumarato (2:1).

O sal produzido foi encaminhado para verificação analítica de pureza e estrutural, por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS) e RMN (ressonância magnética nuclear) do carbono e hidrogênio. O composto foi estocado

a -20°C , protegido da luz até o uso. O fluxograma de síntese encontra-se na figura 11.

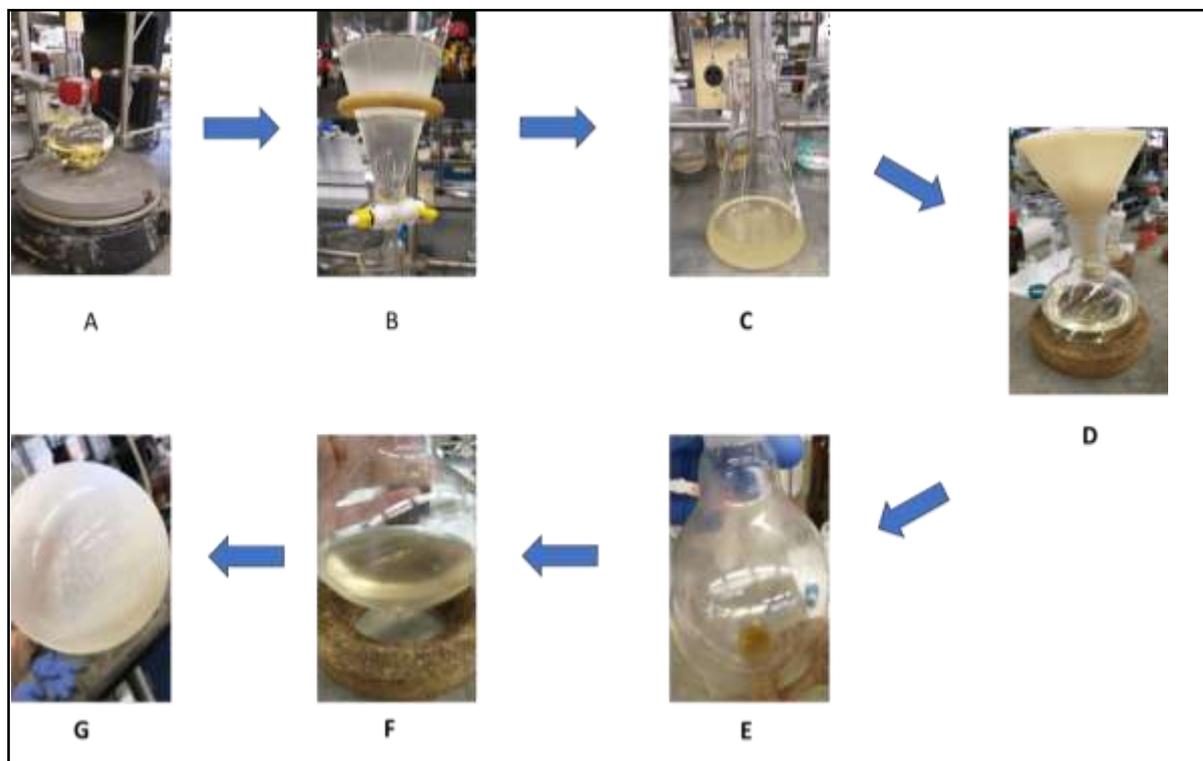


Figura 11 - Fluxograma do processo de síntese de DMT. Em A, a solução de triptamina, ácido acético glacial, metanol, cianoborohidreto e formaldeído; B, material não purificado diluído em CH_2Cl_2 (diclorometano) e NaOH (aq) no funil de extração; C, material coletado após extrações; D, filtração da fase orgânica combinada com Mg_2SO_4 ; E, material concentrado após pressão reduzida; F, material dissolvido em solução de acetona e ácido fumárico; G, sólido branco precipitado após diminuição da temperatura.

4.10.1. Análise em espectrometria de massas

O material sintetizado foi submetido a identificação através do espectro de massas (GS/MS - cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas) no laboratório do professor Dr. Hélio Alexandre Stefani com a colaboração da doutoranda Isadora Oliveira. Desta forma, para análise GS/MS, foi solubilizado em $500\ \mu\text{L}$ de metanol $10,66\ \text{g}$ do produto de síntese, vortexado e enviado para análise em GCMS (GCMS-5977 – MassHunter GC/MS Acquisition B.07.04.2260 – Agilent Technologies).

A quantificação da substância psicoativa foi realizada através de com colaboração do professor Dr. Mauricio Yonamine e da doutoranda Gabriela de Oliveira Silveira, da FCF-USP. A quantificação foi realizada através de uma análise

comparativa da amostra sintetizada com uma curva de concentração de DMT puro. Foi realizada uma curva de calibração de 1.5 a 400 ng/mL e os controles de qualidade a 160 ng/mL e 320 ng/mL (variação aceitável de +- 15%). Em seguida, foi preparada uma solução do DMT sintetizado a 1 mg/mL (solução A) e essa solução passou por uma diluição seriada em quatro etapas para que chegasse a concentração de 250 ng/mL.

4.10.2. Análise em RMN (ressonância magnética nuclear)

Inicialmente, foi pesado uma porção do produto de síntese, aproximadamente 510 ng (nanogramas). Esta quantidade de produto foi solubilizada, por vórtex, em 500 µL de solvente metanol deuterado (MEOD – Sigma-530530-0.75 mL) para análise H¹ e CDCl₃ (clorofórmio-d₁) para análise C¹³, em tubo específico para análise de RNM. Verificar se a solução está com cerca de 4,5 a 5,0 centímetros de altura no tubo. O tubo foi limpo para retirar marcas e identificado com papeletas contendo: nome do solicitante da análise, número de solicitação de análise, solvente e experimento(s). Em seguida a amostra foi encaminhada para análise no RMN (espectrômetro de RMN Bruker Avance -DPX 300 MHz com sonda de 5 mm multinuclear).

Foram feitas análises dos núcleos de H¹ (hidrogênio) e C¹³ (carbono) provendo resultados sobre a estrutura do produto sintetizado.

4.11. Análises de bioinformática

4.11.1. Análise *in silico* de AhR no banco de dados

A análise *in silico* utilizando o banco de dados de genômica de câncer multidimensional, através do *CbioCancer Center Genomics Portal*, que usa banco de dados do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) e do NIH (*National Institute of Health*) foi realizada para avaliar a expressão de AhR entre amostras de pacientes ^(101,102).

4.11.2. Boxplot da expressão de AhR nos estágios do melanoma

Para avaliar a expressão de AhR nos estágios de desenvolvimento do melanoma: nevus comum, nevus displásico, melanoma RGP (fase de crescimento radial), melanoma VGP (fase de crescimento vertical) e metastático, utilizamos dois bancos de dados públicos localizados no repositório *Gene Expression Omnibus*

(GEO) do *National Center for Biotechnology Information*. Utilizamos os repositórios GSE12391 e GSE46517. O *script para análise de expressão de mRNA de AhR* usando a linguagem de programação 'R', encontra-se em anexo. Este ensaio foi realizado em colaboração com Ms. Luis Roberto Masao Watanabe, do laboratório de Citopatologia, FCF-USP.

4.11.3. Interactoma entre AhR e DMT

As análises de interactoma foram realizadas em colaboração com o Dr. Gláucio Monteiro Ferreira e Dr. Victor Fernandes de Oliveira, do laboratório Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico (LABMAD), FCF – USP.

Para a análise inicial do interactoma foi utilizada a ferramenta STRING para analisar a associação de proteína-proteína através das redes de interação. Em seguida, utilizamos o repositório STITCH. O STITCH utiliza os mesmos bancos de dados do STRING, contudo apresenta informações sobre a interação entre proteínas além de outras moléculas, como fármacos. Foi inserido manualmente todos os genes: AhR, NRAs, juntamente com o DMT tendo o genoma de referência humano.

4.12. Análise estatística

A significância estatística das diferenças entre os valores médios de todos os grupos experimentais foi calculada utilizando Teste *t* de *Student*. Valores de *p*, sendo $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

O *bloxplot* teve suas caixas comparadas através da análise estatística One-Way Anova, e pelo teste de Tukey. $*p < 0.05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

Os resultados da tese serão separados em três capítulos de acordo com os objetivos da tese. Em seguida, segue-se a discussão referente aos resultados dos respectivos capítulos.

O primeiro capítulo retrata os resultados obtidos acerca da avaliação da expressão basal do receptor aril de hidrocarbonetos nas linhagens de melanoma mutadas para NRAS, BRAF e BRAF resistentes ao Vemirafenib. O segundo capítulo se remete a construção das linhagens de melanomas editados geneticamente para o receptor AhR pela ferramenta CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- associated protein-9 nuclease*). E o terceiro capítulo aborda o papel de AhR nos efeitos biológicos de metabólitos do triptofano sobre linhagens de melanoma, objetivando a interação do receptor com o DMT.

Capítulo I

Expressão do receptor aril de hidrocarbonetos em linhagens de melanoma mutadas para NRAS, BRAF e BRAF resistentes ao Vemurafenib⁴⁷

5.1. Avaliação dos níveis basais de expressão mRNA de AhR em células de melanoma e melanócito

A partir dessa análise podemos identificar quais linhagens de melanoma apresentaram variação de expressão basal de AhR em relação ao melanócito, célula considerada como perfil de expressão basal para as células derivadas tumorais, os melanomas.

Inicialmente, observamos que as linhagens parentais de melanoma mutadas para NRAS e BRAF apresentaram, em sua maioria, valores maiores de mRNA que o melanócito. Apenas as linhagens SK-Mel103, SK-Mel28 e SK-Mel29 parental apresentaram menor valor de mRNA quando comparadas ao melanócito. Somam-se então 5 linhagens, com expressão superior de AhR, que são as linhagens BRAF mutadas, a SK-Mel19, WM164, A375, WM793 e UACC62. Ainda, podemos destacar que a maioria das linhagens que apresentaram expressão de mRNA de AhR superior ao melanócito, contém a mutação BRAF^{V600E}. Dentre as linhagens mutadas em NRAS apenas a linhagem SK-Mel173 apresentou maior quantidade de mRNA, cerca de 7 vezes maior, em relação ao controle (figura 12).

Estes resultados nos levam a discutir a importância de AhR em processos biológicos durante para a transformação maligna, já que melanomas apresentam um número de cópias de mRNA superior ao melanócito. Ainda, nos sugere que há uma maior expressão de mRNA de AhR nas fases iniciais de desenvolvimento e principalmente na fase metastática do melanoma (ver linhagens UACC257 e WM793). Também, que a presença da mutação em BRAF^{V600E} pode estar associada a um aumento da expressão de mRNA de AhR em melanomas.

Estes dados corroboram com nossa análise *in silico*, utilizando o banco de dados de genômica de câncer multidimensional, identificamos que 18% dos pacientes apresentavam alterações na expressão de AhR. A presença de alteração em AhR é muito frequente (18%). A plataforma mostrou que existe variação na expressão de AhR derivada do aumento de mRNA de AhR, ou ainda da alteração derivada da amplificação (barras vermelhas) e também a ocorrência de mutação *missense* (barras com marcação verde) (figura 13).

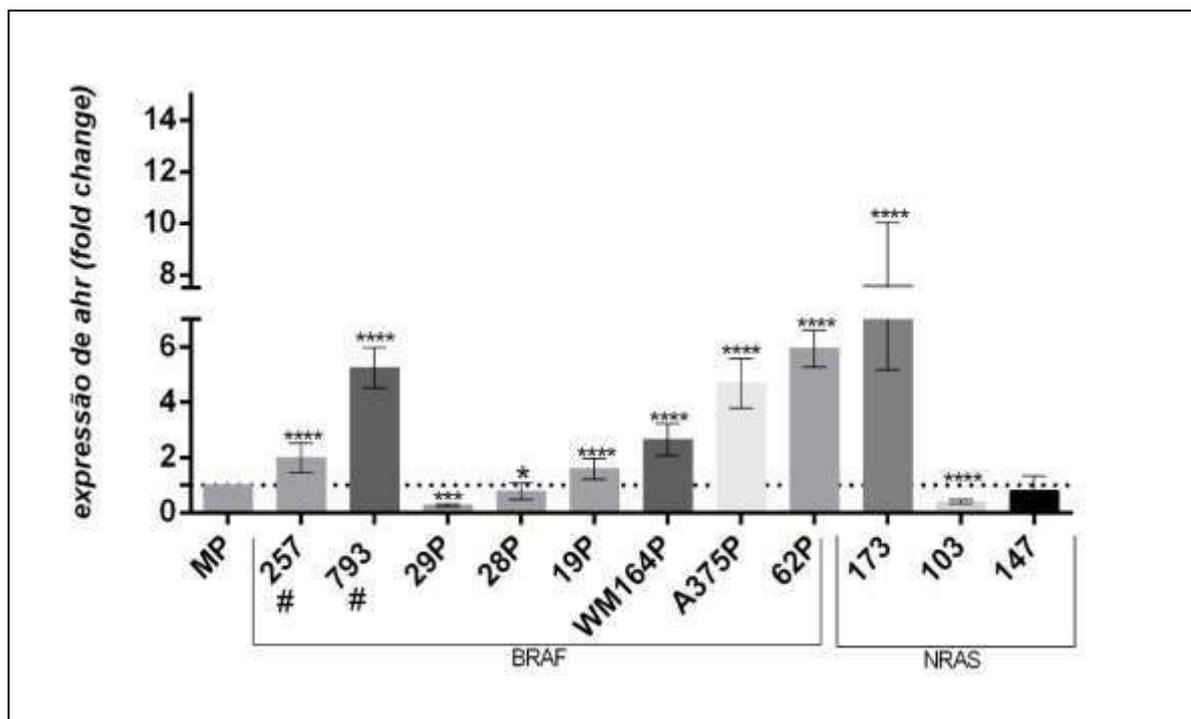


Figura 12 - Análise do transcrito de AhR em linhagens de melanoma mutadas para BRAF e NRAS em relação ao melanócito. O melanócito (MP) foi considerado como uma célula de controle para avaliar a expressão mRNA basal de AhR nas linhagens de melanoma. #, linhagem derivada de desenvolvimento primário e as demais são metastáticas. As barras representam a média \pm erro padrão (SEM) do número de cópias do transcrito de AhR normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* (n=9). *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.

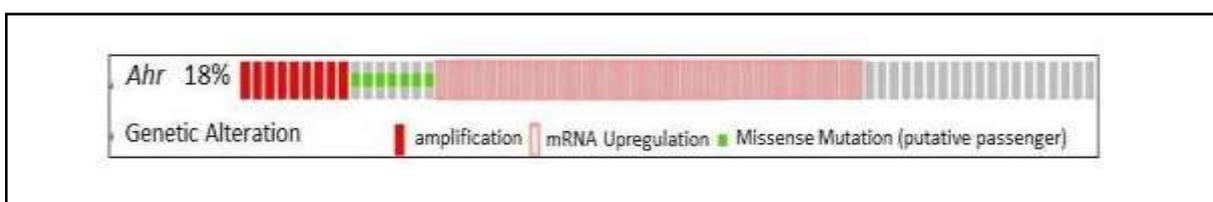


Figura 13 - Análise *in silico* de AhR. A análise do banco de dados através do The *CbioCancer Center Genomics Portal* mostrou que em 18% dos pacientes, a variação da expressão de AhR se deve a variação no mRNA (barras rosa), ou pela alteração derivada da amplificação (barras vermelhas) e também pela ocorrência de mutação *missense* (barras com marcação verde).

Uma vez que existe diferença da expressão de AhR entre as linhagens de melanoma, avaliamos a expressão de AhR entre os estágios de desenvolvimento do melanoma: nevus comum, nevus displásico, melanoma RGP (fase de crescimento radial), melanoma VGP (fase de crescimento vertical) e metastático. Para isto, utilizamos dois bancos de dados públicos localizados no repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO) do *National Center for Biotechnology Information*,

conforme mencionado em material e métodos. Aqui, mostramos apenas o *boxplot*, construído mediante análise no banco GSE12391, que apresentou diferença significativa de mRNA de AhR.

Como pode ser observado na figura 14, existe uma diferença da expressão de mRNA do receptor entre os estágios de nevo comum e de melanoma em crescimento vertical (melanoma VGP). Dentre as demais comparações não foi possível observar diferença significativa dentre as amostras de pacientes nos diferentes estágios.

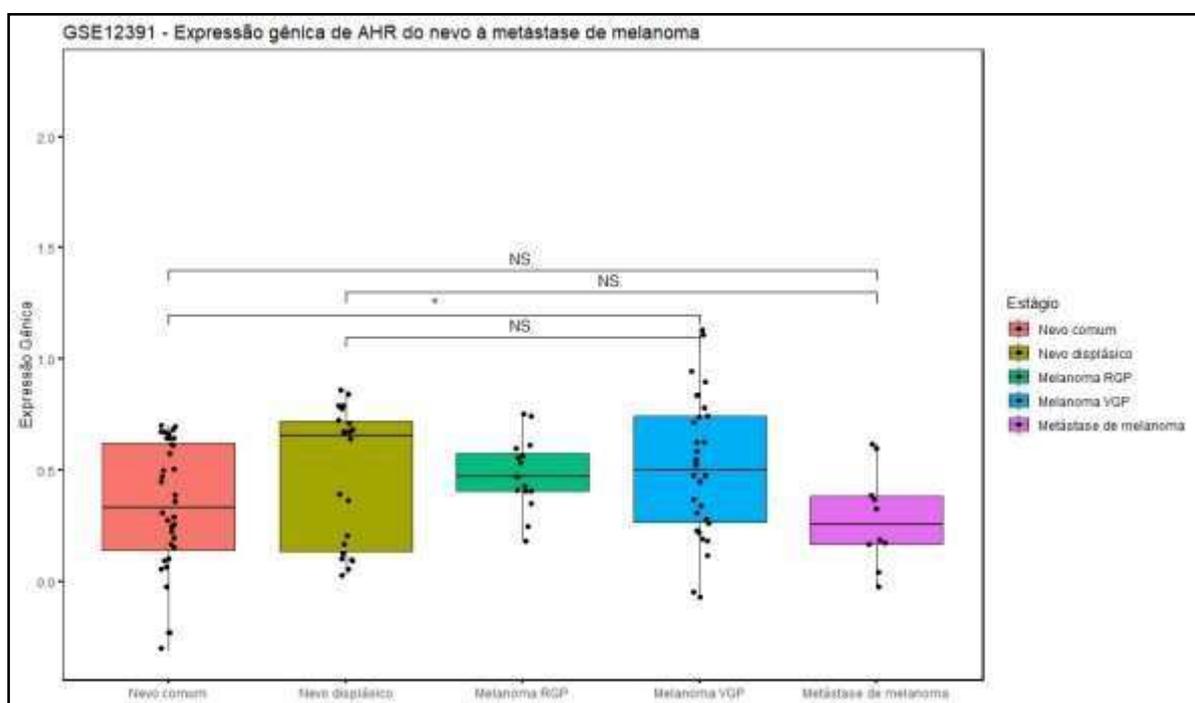


Figura 14 - *Boxplot* da expressão de AhR nos estágios do melanoma: nevo comum, nevo displásico, melanoma RGP (fase de crescimento radial), melanoma VGP (fase de crescimento vertical) e metastático. Sendo que, cada ponto representa uma amostra de paciente; em cada box, as barras inferiores, barras médias e superiores representam os primeiros, as medianas e os terceiros quartis, respectivamente. As caixas foram comparadas através da análise estatística One-Way Anova, e pelo teste de Tukey. * $p < 0.05$ foram considerados significativos.

Em outra abordagem dos dados de expressão de mRNA de AhR, comparamos a expressão de mRNA entre as respectivas linhagens parentais e resistentes. Assim, observamos que as linhagens resistentes de SK-Mel29, SK-Mel19, WM164, SK-Mel28 e UACC62 apresentaram maior expressão de mRNA de

AhR em comparação às parentais (figura 15). Apenas a linhagem A375 resistente apresentou resultado contrário. Apenas a linhagem A375 resistente apresentou resultado contrário. É interessante notar que todas estas linhagens apresentam a mutação BRAF^{V600E}. Este dado nos leva a hipótese de que o AhR está relacionado a resistência tumoral em linhagens mutadas para BRAF^{V600E}.

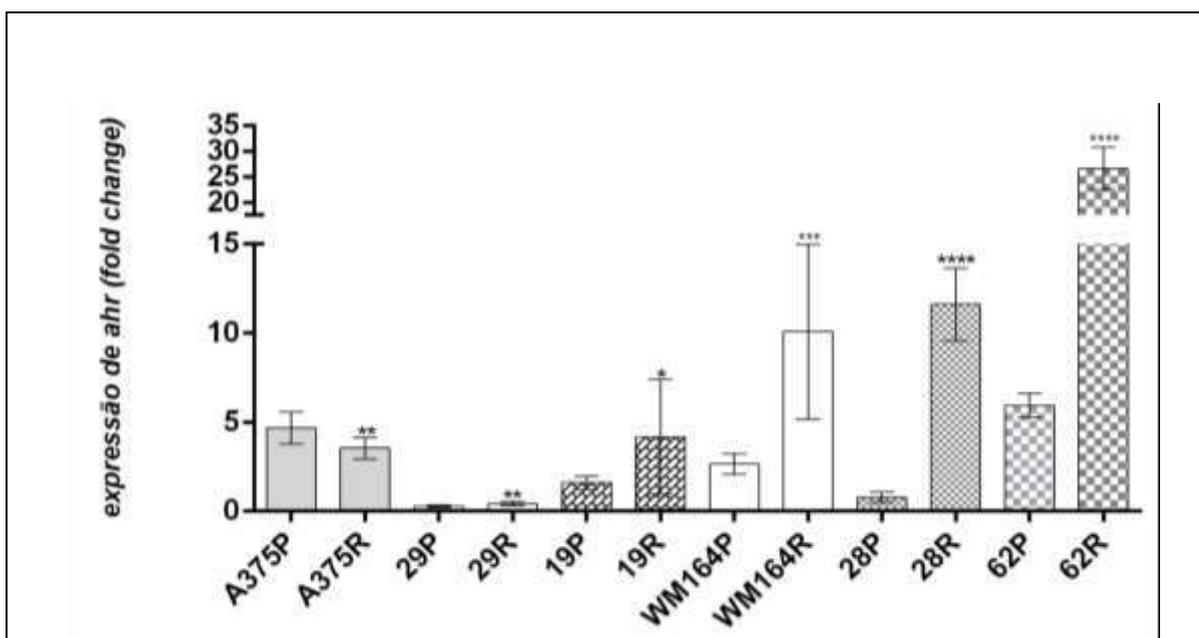


Figura 15 - Comparação da expressão relativa do número de cópias do transcrito AhR em diferentes linhagens de melanoma parentais e resistentes. A célula parental e sua linhagem derivada resistente foi considerada como controle para avaliar a expressão mRNA basal de AhR. As barras representam a média ± erro padrão (SEM) do número de cópias do transcrito de AhR normalizado pelo número de cópias do transcrito de *gapdh* (n=9). *p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.

5.2 Discussão

Ao avaliar os níveis basais de mRNA de AhR no painel de linhagens mutadas para NRAS e BRAF (figura 12), observamos que há uma maior expressão de mRNA de AhR nas linhagens em relação ao melanócito. Nossa hipótese é que esta variação de AhR pode estar relacionada a participação do receptor nos processos iniciais de formação tumoral.

Estudos realizados com camundongos nocautes para AhR mostraram que a perda do receptor está associada a uma diminuição da taxa de proliferação e um

aumento do número de células na fase G0/G1 do ciclo celular. Esta diminuição na proliferação, pode ser devido a formação de um complexo entre o receptor com a proteína pRb, resultando na modulação de efeitos relacionados ao ciclo celular de linhagens tumorais ⁽⁶⁷⁾.

Além disso, o *knockdown* de AhR em linhagens tumorais humanas mostrou uma redução do crescimento celular e este resultado foi acompanhado pela diminuição da regulação de vários genes relacionados ao ciclo celular como, ciclinas D1 e E, cdk2 (quinase dependente de ciclina 2) e cdk4 (quinase dependente de ciclina 4). Embora estes resultados sustentem nossa hipótese da relação da participação de AhR nos processos iniciais de formação tumoral, há registros na literatura que apontam que o receptor pode ter ação dúbia em processos biológicos importantes e na tumorigênese, agindo de forma a depender do contexto celular ⁽⁶⁷⁾.

O aumento da expressão de mRNA de AhR no painel de células mutadas, também foi encontrado tanto quando fizemos a análise *in silico* de um conjunto de amostras de melanomas de pacientes usando o banco público (figura 13). Além de ambos os resultados se sustentarem, a análise do receptor nas linhagens pode ser correlacionada com o que acontece em pacientes, corroborando a importância do papel de AhR no processo tumorigênico.

O aumento da expressão de AhR em linhagens de melanoma parentais em relação ao melanócito, se deu tanto em linhagens derivadas da fase de desenvolvimento primário e metastática. No processo de invasão e migração, ações iniciais da metástase, há uma reprogramação celular que permite que a célula tumoral exiba fatores necessários ao desprendimento da massa celular, a contração celular, o deslocamento, além da invasão e fixação em novo microambiente metastático ⁽¹⁰³⁾.

De acordo com nossos resultados, a maior expressão de AhR em linhagens metastáticas, além de maior expressão em amostra de pacientes derivadas de melanoma de crescimento vertical (figura 14), apontam para a participação do receptor em processos de migração e invasão celular. O resultado mostrado no *bloxplot* é bastante interessante, já que a maior expressão de mRNA de AhR na fase de crescimento vertical antecede o estágio de metastização tumoral. Assim, AhR desempenha papel de destaque na adesão e migração celular. Um exemplo da função do receptor no contexto metastático são os fibroblastos AhR^{-/-} que apresentavam maior área e menor polarização celular do que fibroblastos AhR^{+/+}. Este dado se conecta a morfologia celular, que tem relação com a organização dos

filamentos de F-actina e com as interações célula-célula e célula-substrato, com participação das proteínas de adesão focal (Fas). Os fibroblastos nocaute para o receptor apresentaram mais fibras de actina e Fas, exibindo uma interrelação de AhR e o citoesqueleto. A família de proteínas RhoA/Rac1 GtPase são reguladoras essenciais da adesão, disseminação e migração celular. De forma que RhoA regula a formação das fibras de actina e aderências, e Rac1 promove a formação de lamelopódios de membrana ⁽¹⁰⁴⁾.

Uma vez que o AhR é ativado, dois caminhos de sinalização podem ser desencadeados, tanto pela ação do receptor como fator transcricional, bem como reações não-genômica iniciadas pela ativação do receptor.

Avaliando o potencial transcricional de AhR, podemos apontar entre os seus genes alvos o proto-oncogene *vav3* (fator de troca nucleotídeo guanina 3 *vav*), que expande a participação do receptor na morfologia, adesão e migração celular. É relatado na literatura a relevância funcional de *vav3/Rac1/RhoA*. Em condições fisiológicas, a atividade de AhR endógeno pode induzir constitutivamente a expressão do gene *vav3*, por conter em sua região promotora sequências consensos responsivas a interação de AhR e xenobióticos (XRE). Tal condição favorece o aumento da atividade de Rac1 (pequena GTPase 1 da família RAC) e RhoA (membro A homólogo da família RAS) dependente de *vav3*, promovendo a protrusão da membrana, reorganização do citoesqueleto e estímulos de migração celular ^(104,105). Tais condições relatadas são bastante relevantes durante o processo de transição epitélio - mesenquimal (EMT) ⁽¹⁰⁵⁾.

Considerando as modificações que o complexo estável do AhR no citoplasma sofre levando a liberação da proteína c-SRC, poderíamos propor um importante papel para a via não-genômica de ativação de AhR. Uma vez liberada, a c-SRC participa de uma cascata de fosforilação em proteínas parceiras e é capaz de interagir com outras proteínas, dentre elas a proteína FAK (quinase de adesão focal) ⁽⁶⁹⁾. A FAK é uma tirosina quinase citoplasmática que desempenha papel fundamental na proliferação (através da interação com as ciclinas D e E, ERK, p27 (proteína p27) e p21 (proteína p21)) e migração de células normais e tumorais. A proteína FAK associa-se com outras proteínas e recruta outras moléculas formando um complexo de sinalização que transmite sinais da matriz extracelular para o citoesqueleto ⁽¹⁰⁶⁾. Tem sido mostrado na literatura a habilidade de FAK promover a invasão celular através de c-SRC através da expressão de metaloproteinase de matriz, tais como MMP2 (metaloproteinase de matriz 2) ⁽¹⁰⁷⁾.

Outro ponto importante, confere a participação da proteína c-SRC na transformação celular, uma vez que é capaz de ativar indiretamente AKT e ERK (70), já que FAK interage com efetores da via de MAPK promovendo a proliferação celular e a supressão da apoptose celular mediada por p53 (108).

De outra forma, em células de tumores mamários, é sabido que as dioxinas (ligante de AhR) são capazes de induzir a reorganização do citoesqueleto e aumentar o número de lamelopódios, que são fatores associados à alta taxa de migração destas células. Mecanicamente tais efeitos observados, mediados pela interação dioxina-AhR, estão relacionados a redução da expressão das proteínas de interação célula-célula, as E-caderinas, por exemplo. Ainda, a dioxina está relacionada à indução da expressão de membros da família de proteínas CAS (susceptibilidade à apoptose celular), que tem sido eleita como um gene pró-metastático em melanomas ⁽¹⁰⁴⁾, desempenhando papel fundamental na regulação da proteína FAK envolvida na migração celular ⁽¹⁰⁶⁾.

Partindo de uma segunda organização dos resultados de mRNA obtidos por nós, observamos que a maioria das linhagens resistentes, mutadas em BRAF^{V600E}, apresentaram maiores valores de AhR em relação a sua correspondente linhagem parental (figura 15). Este dado nos leva a hipótese de que o AhR está relacionado a resistência tumoral em linhagens mutadas para BRAF^{V600E}. Este resultado é bastante importante, uma vez que nos propõe a pensar o que ocorre na clínica. Já que cerca de 50% dos melanomas contém a mutação BRAF^{V600E}, e que esta mutação é considerada no uso de terapia direcionada com administração do Vemurafenib ⁽⁴⁾. E que mesmo com efeitos iniciais satisfatórios há registros recorrentes de recidiva ⁽³¹⁾.

Vários são os meios de manter a via da MAPK constitutivamente ativa em células mutadas para BRAF^{V600E} (conforme mostrado na introdução). Há relatos na literatura que MAPK/ERK ativa constitutivamente levam a uma superexpressão do receptor. Contudo, não se tem certeza se a BRAF^{V600E} induz um aumento da expressão ou estabilidade do receptor ou se reduz a sua degradação. A partir disso, a superexpressão de AhR pode estar associada com o consequente favorecimento da expressão gênica modulada por AhR, atuando como fator de transcrição ⁽¹⁰⁹⁾.

Além disso, vários ativadores de AhR também tem como alvo a via de MAPK em diferentes níveis e sistemas celulares ⁽¹⁰⁹⁾. O TCDD, um dos ligantes clássicos de AhR, pode ativar ERK e JNK (quinase N-terminal Jun), outros importantes mediadores de transdução de sinal celular, e consequentemente estimular a via de

MAPK ^(109,110). Este estímulo na via de MAPK pode ser através da atividade de AhR e da expressão gênica dependente do receptor ⁽¹¹¹⁾. Entretanto, muito embora esta ativação de MAPK seja viável por AhR, há relatos de que este processo possa ocorrer de forma independente do receptor ⁽¹¹⁰⁾.

De certa forma, assimilando toda a literatura apresentada, poderíamos sugerir um *crossstalk* na regulação de AhR-MAPK, de forma que o AhR ativado por seus ligantes desenvolve uma cascata de reações que culmina na ativação de MAPK. E que ao mesmo tempo, MAPK pode ser ativada por TDCC, um agonista de AhR. Uma vez que a via de MAPK encontra-se ativa, seja pelo próprio AhR ativado ou pela ativação constitutiva de BRAF^{V600E}, a MAPK também é capaz de manter alta expressão do receptor e assim promover respostas biológicas dependentes da participação deste receptor.

Nossos resultados são bastante relevantes para contribuir na especulação do papel de AhR no melanoma, a sua associação com a mutação BRAF e com a resistência ao Vemurafenib.

Capítulo II

Construção da linhagem nocaute para o receptor aril de hidrocarbonetos

5.3 Construção do vetor e da sequência guia – CRISPR-Cas9

A construção do vetor lentiviral com a sequência guia e as etapas subsequentes a obtenção da linhagem nocaute serão detalhadas nesta seção.

Para estabelecer a ferramenta de edição CRISPR-Cas9 utilizamos os vetores *helpers* (p59, p60 e p61), que contém as informações necessárias para a formação da partícula lentiviral (estrutura dos vetores em anexo). O vetor lentCRISPRV2 (Addgene) foi usado como esqueleto para ancoragem das sequências guias, que também tem partes de informações sobre a montagem da partícula lentiviral (estrutura do vetor em anexo). Ainda utilizamos este esqueleto para ancoragem do gene repórter (GFP – proteína fluorescente verde) usado como controle da transfecção celular. Também ao processo total de preparo de bactérias competentes, usamos o vetor pPIC9K (Invitrogen) que serviu de controle da transformação nos ensaios de transformação e clonagem bacteriana (estrutura do vetor em anexo).

Inicialmente, os vetores lentivirais foram utilizados em protocolos de clonagem bacteriana. Para aumentar a massa dos vetores foram utilizadas bactérias *E.coli Dh5α* nos protocolos de clonagem e transformação bacteriana apresentados em material e métodos. Nesta etapa, acrescentamos o uso do vetor pPIC9K para controle da transformação bacteriana, a fim de certificarmos o crescimento de bactérias transformadas em placas de cultura com pressão de seleção com o uso de penicilina (100 mg/mL). Posteriormente, o material vetorial foi extraído das bactérias através de protocolos de extração de acordo com o fabricante.

A segunda etapa do protocolo, consiste em certificar os *helpers* para posterior ensaio de transfecção. Os vetores *helpers* (p59, p60 e p61) foram usados em reações de clivagem por endonucleases para confirmação dos mesmos pelo padrão de fragmentos linearizados observados em gel de agarose (figura 16). Os fragmentos esperados para cada digestão encontram-se na tabela 5.

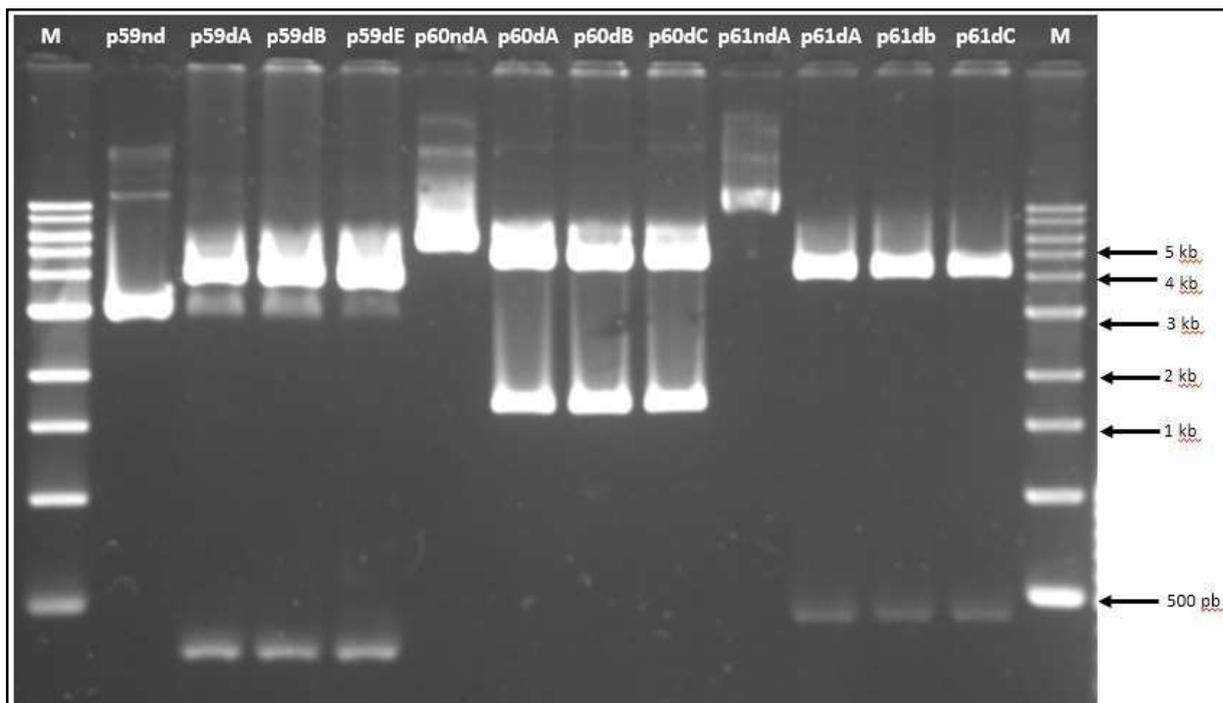


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose dos vetores lentivirais *helpers* p59, p60 e p61 clivados por *EcoRI* e *BamHI*. Em M, o padrão molecular (1 kb – New England Biolabs). Nas canaletas 1-4, p59 não clivado e clones p59A, p59B e p59E clivados com *EcoRI*, respectivamente. Canaletas 5-8, p60 não clivado e clones p60A, p60B e p60C clivados com *BamHI*, respectivamente. E nas canaletas 9-12, p61 não clivado e clones p61A, p61B e p61C clivados com *EcoRI*, respectivamente.

Tabela 5 – Fragmentos dos vetores *helpers* clivados com endonucleases para confirmação por padrão de clivagem.

Vetor <i>helper</i>	Enzima de restrição	Tamanho dos fragmentos esperados
p59	<i>EcoRI</i>	3389 pb e 309 pb
p60	<i>BamHI</i>	1660 pb e 4740 pb
p61	<i>EcoRI</i>	4341 pb e 4153 pb e 401 pb

Inicialmente, para a montagem do vetor contendo a sequência guia um fragmento de 20 nucleotídeos foi gerado através da plataforma (<http://www.genome-engineering.org>), de acordo com suas instruções. O *input* do nome do receptor (AhR) no sistema gerou uma lista de sequências guias possíveis. Este conjunto de sequências geradas pelo site foi avaliado e ranqueado quanto ao número de *off target* de cada sequência. As sequências de menor *off target* foram selecionadas

para a próxima etapa. Estas sequências selecionadas foram usadas como base para desenhar as sequências guias de acordo com as instruções contidas no protocolo (*Designing Guides for lentiCRISPRv2 and lentiGuide-Puro* – Addgene - <http://www.genome-engineering.org/>). Os fragmentos de 20 nucleotídeos gerados e as sequências guias *forward* e *reverse* desenhadas encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 - Sequências guias escolhidas e desenhadas para compor o sistema CRISPR-Cas9 para *knockout* de AhR em melanoma.

Gui a	Sequência guia escolhida (site)	Sequência guia desenhada Sequência sense 5' – 3'	Sequência guia desenhada Sequência anti-sense 5' – 3'
1	AAGTCGGTCTCTATG CCGCT TGG	CACCGAAGTCGGTCTCTAT GCCGCT	AAACAGCGGCATAGAGAC CGACTTC
2	TAATACAGAGTTGGA CCGTT TGG	CACCGTAATACAGAGTTG GACCGTT	AAACAACGGTCCAACCTCTG TATTAC

Para validar as sequências guias 1 e 2, a sequência gênica do receptor aril de hidrocarbonetos foi retirada dos bancos de dados do NCBI e *Ensembl*. A sequência do RNA mensageiro (mRNA) depositada com o número de referência no NCBI e para o *Ensembl* são respectivamente, NM_001621.4 e ENST00000242057.8. O número do depósito da sequência do gene de acordo com o *Ensembl* é ENSG 00000106546. Estas informações foram usadas para certificar a correspondência das sequências guias no alvo genético. Analisando as sequências guias observamos um reconhecimento destas com o segundo éxon de AhR (dados não mostrados).

Mediante as sequências guias construídas, as células empacotadoras HEK293FT foram usadas para a produção da partícula lentiviral de acordo com o protocolo de transfecção conforme descrito em material e métodos.

Nesta etapa do protocolo CRISPR-Cas9, adicionamos um vetor controle contendo um gene repórter para o controle da transfecção e da produção de partículas lentivirais. Assim, foram adicionados um *mix* vetorial as células HEK293FT conforme descrito em materiais e métodos. Como resultado da transfecção pôde-se observar uma fluorescência verde em toda a extensão das células empacotadoras que receberam junto com o *mix* de DNA (vetores lentivirais) um vetor com gene

repórter. A fluorescência das células empacotadoras pode ser observada na figura 17.

Como podemos observar na figura 17, as células exibiram uma marcação verde. Esta fluorescência aponta para um sucesso na introdução dos vetores nas células HEK293FT, e conseqüente capacidade de leitura da informação contida nestes vetores pela célula empacotadora. A fluorescência observada projeta a uma possível eficiência na produção das partículas lentivirais por estas células. Já que as informações do vetor contendo o repórter foram expressadas conclui-se que, os vetores *helpers* e o lentCRISPRV2 com as sequências guias, também tiveram seus elementos expressados.

A etapa seguinte compreende a infecção das linhagens de melanoma pelas partículas lentivirais. O protocolo de infecção foi realizado na linhagem *Wide type* (Wt) SK-Mel147. As titulações virais usadas foram de 1:3 e 1:6. A seleção das células após infecção, foi realizada com adição de puromicina às culturas na concentração de 0,5 µg/mL.

Nesta etapa, as células não estavam de acordo com nosso protocolo de extração proteica, necessário para confirmação da construção de linhagem nocaute. Foram necessários ajustes na cultura para obter uma população celular que fosse capaz de se manter e a partir dela expandir o cultivo, e posteriormente realizar o ensaio de *Western blotting*. O ensaio de *Western blotting* para avaliação da expressão de AhR na cultura submetida ao protocolo CRISPR-Cas9 está apresentado abaixo (figura 18).

Na figura 18, a titulação lentiviral de 1:6 mostrou-se mais eficiente na infecção, levando a uma reduzida expressão de AhR nas células que receberam as partículas lentivirais contendo o guide 1 em comparação com as células que receberam a partícula contendo o guide 2, ambas comparadas com os controles selvagem (Wt) e que receberam a partícula lentiviral sem guide. Diante desse resultado, com a titulação da partícula lentiviral em 1:6, podemos apontar para o nocaute de AhR, apresentando uma negativa expressão do receptor.

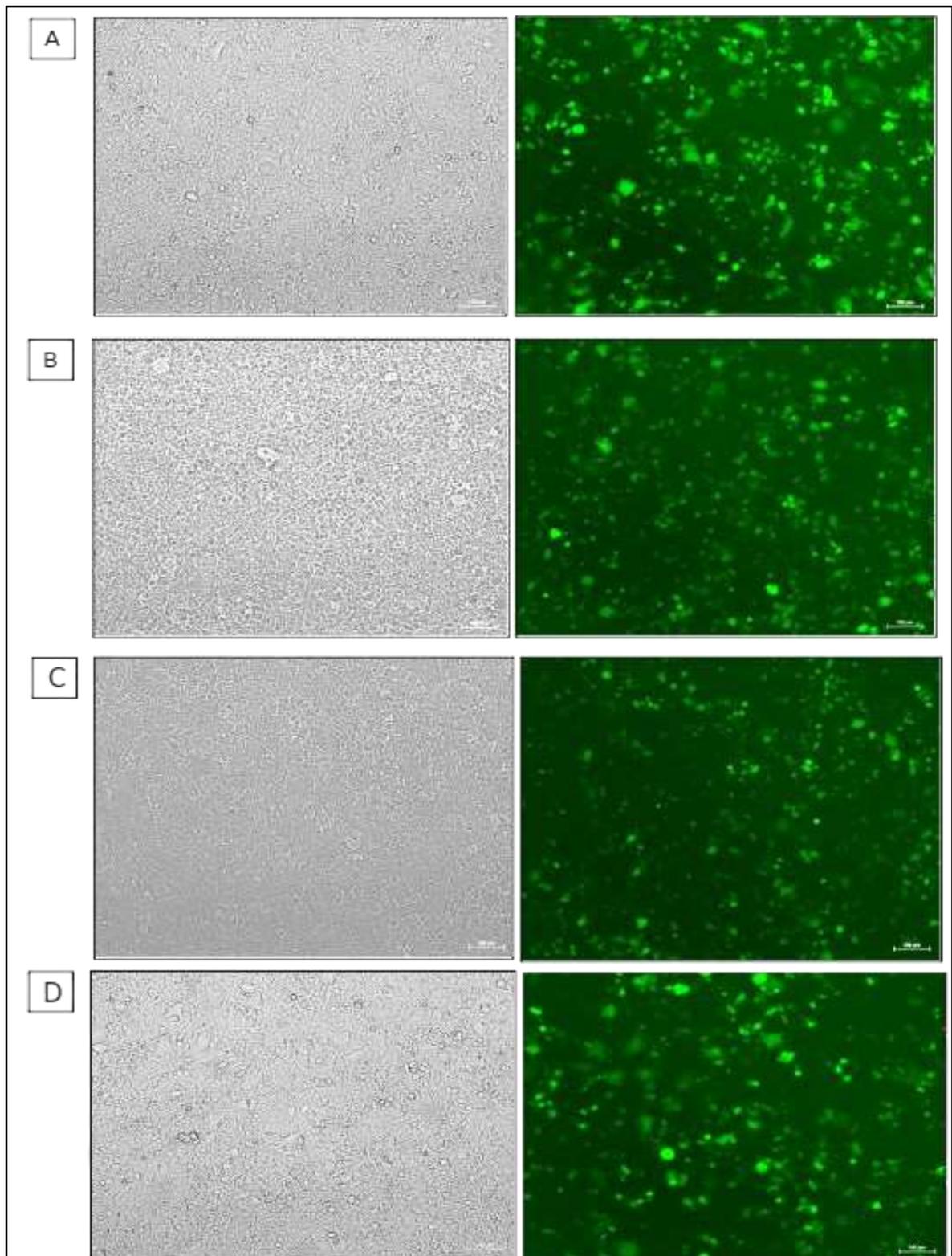


Figura 17 - Cultura de células empacotadoras HEK293FT 24 horas pós transfecção dos vetores lentivirais. Em associação aos vetores *helpers* adicionamos em A, a transfecção do vetor lentiguide1 (vetor contendo sequência guia 1); em B, o lentiguide2 (vetor contendo sequência guia 2); e em C, o lentiguideV2 (vetor controle da transfecção); em D, vetor com repórter EGFP (controle da transfecção). Imagens tiradas através do microscópio de fluorescência Nikon ECLIPSE TS100 – Cfi60 no aumento de 10X (Plan Fluor ELWD 40X DIC M N 1. Barra:100 μ M).

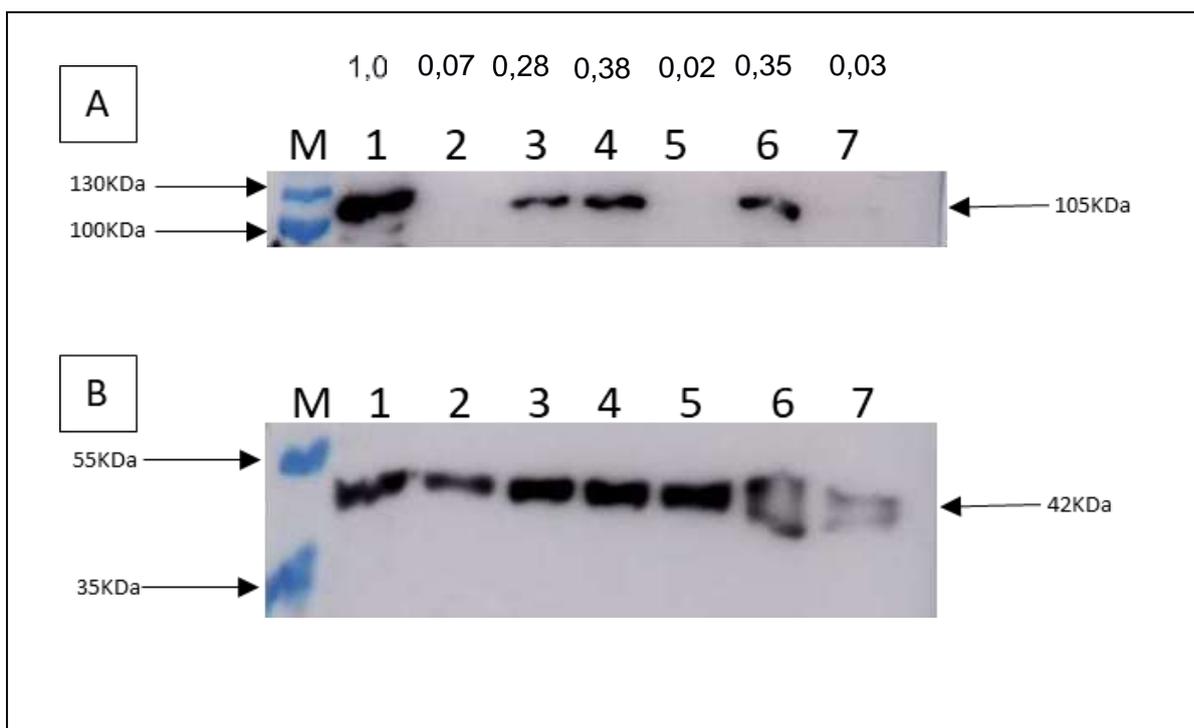


Figura 18 - Análise do nocaute de AhR por *western blotting* na linhagem de melanoma SK-Mel147. Na figura A detecção do receptor aril de hidrocarbonetos (tamanho predito de 105 kDa) e em B detecção do endógeno beta-actina (42 kDa). Temos em M, marcador de peso molecular; em 1, Sk-Mel147 *wilde type*; em 2, amostra controle de melanoma transfectadas com lentCRISPRV2 na titulação da partícula lentiviral em 1:3; em 3, amostra controle de melanoma transfectadas com lentCRISPRV2 na titulação da partícula lentiviral em 1:6; em 4, amostra de melanoma transfectadas com lentCRISPRV2 contendo a sequência guia 1 na titulação da partícula lentiviral em 1:3; em 5, amostra de melanoma transfectadas com lentCRISPRV2 contendo a sequência guia 1 na titulação da partícula lentiviral em 1:6; em 6, amostra de melanoma transfectadas com lentCRISPRV2 contendo a sequência guia 2 na titulação da partícula lentiviral em 1:3; e em 7, amostra de melanoma transfectadas com lentCRISPRV2 contendo a sequência guia 2 na titulação da partícula lentiviral em 1:6. Marcadores de peso molecular foram mostrados nos painéis. Acima da imagem A, estão os valores correspondentes a quantificação proteica normalizada.

A partir deste resultado, optamos por não fazer uma seleção clonal desta cultura submetida a titulação viral de 1:6, devido a grande diferença de expressão observada entre as amostras editadas e as amostras controles, que receberam o vetor lentiCRISPRV2 e selvagem. Então, a etapa seguinte foi a expansão das culturas que receberam os guides 1 e 2 na titulação (1:6). Durante a manutenção da cultura, observamos células de melanoma gigantes em relação à morfologia padrão, como pode ser observado na figura 19.

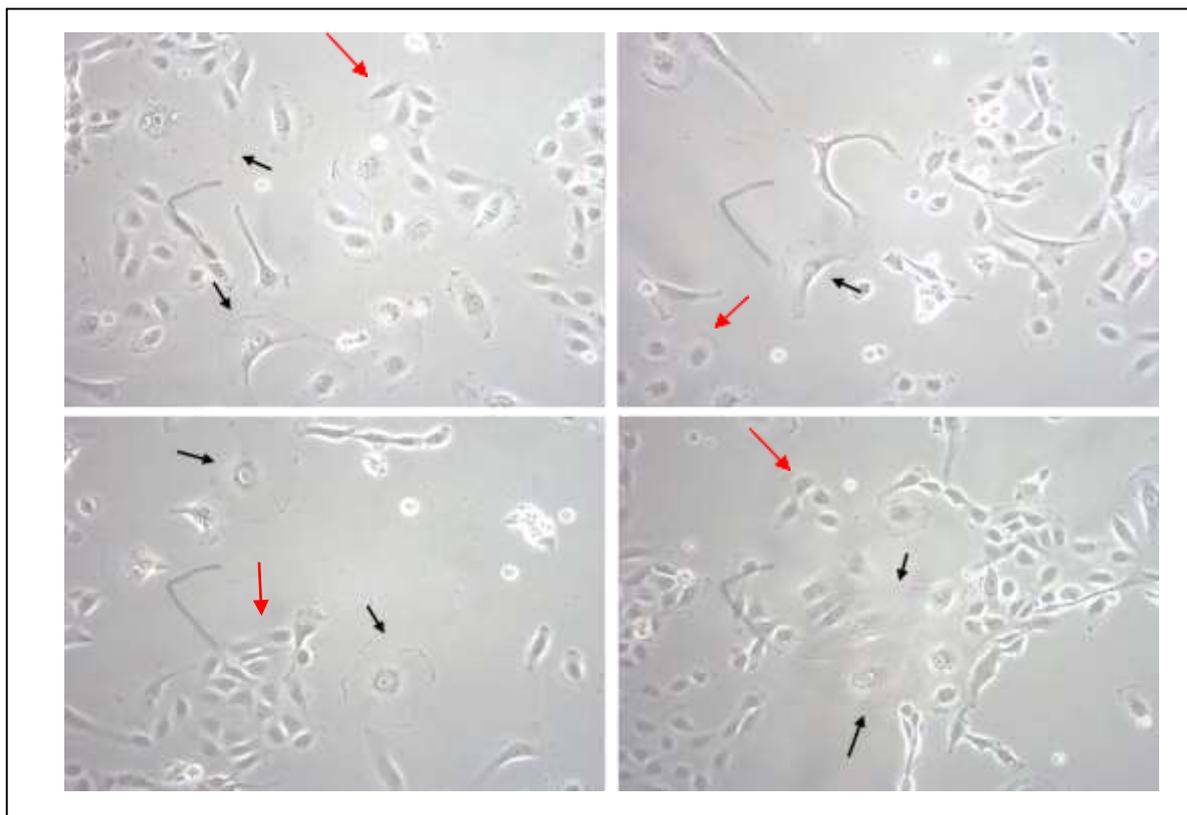


Figura 19 - Cultura de células da linhagem SK-Mel147 após protocolo CRISPR-Cas9. As setas pretas apontam para as células que apresentam variação morfológica na cultura dentre as de morfologia padrão (setas vermelhas). Foto tirada em microscópio Nikon Eclipse NS100, com aumento 20x.

Estas células apresentavam grande citoplasma em relação às células vizinhas (ver as setas direcionando as células), que exibiam o modelo morfológico padrão da linhagem. Também, devemos ressaltar que a cultura apresentou um menor crescimento (obtenção de confluência celular) em relação a cultura selvagem de SK-Mel147.

Observamos, que além da mudança morfológica, após a infecção a cultura das células editadas exibiram menor proliferação celular. As células apresentaram um maior intervalo de tempo para atingir uma confluência satisfatória para manuseio e expansão da cultura celular. Após um intervalo de tempo superior ao padrão para cultivo da linhagem SK-Mel147, obtivemos a cultura celular apta ao manejo e seguimos para a etapa de verificação da manutenção do nocaute na cultura após crescimento populacional desejado.

Durante o manejo das culturas, vários ensaios de *western blotting* foram realizados na tentativa de confirmar o nocaute de AhR. Apesar disso, não

conseguimos provar a manutenção do nocaute de AhR na linhagem SK-Mel147 (figura 20). Para obter estes resultados, testamos várias estratégias, como troca do protocolo de extração proteica, curva de volume de RIPA, variação no gel e/ou tempo de bloqueio por exemplo (tabela 7).

Tabela 7 – Variações no protocolo de *Western blotting* para atingir a visualização da proteína (AhR) de linhagens celulares.

Material	Testes		
Células	Linhagens apresentadas na tabela (exceto 257 e 793) e linhagens de HeLa (controle endógeno – beta-actina) e SiHa (controle externo para AHR) como controles positivos para proteínas testadas.		
Concentração de proteína total	40 µg	50 µg	100 µg
Solução de bloqueio (preparadas em TBS-T)	5% leite em pó desnatado	5% de albumina	5% - ECL Advanced TM blocking agent, CPK1075 GE Healthcare UK limited.
Diluição anti-AHR (anticorpo primário)	5% leite em pó desnatado	TBS-T 0,125% de leite	TBS-T
	1:500/1:1.000/1:3.000		
Lote do anticorpo primário anti-AHR	Lotes usados: GR237472-3/ GR3174031-1/GR237472-13		
Diluição anti-AHR (anticorpo secundário)	1:10.000 e 1:5000 em TBS-T		
Tampão de transferência	Adição de SDS 0.1 %		
Membrana	Membranas de nitrocelulose e de PVDF		

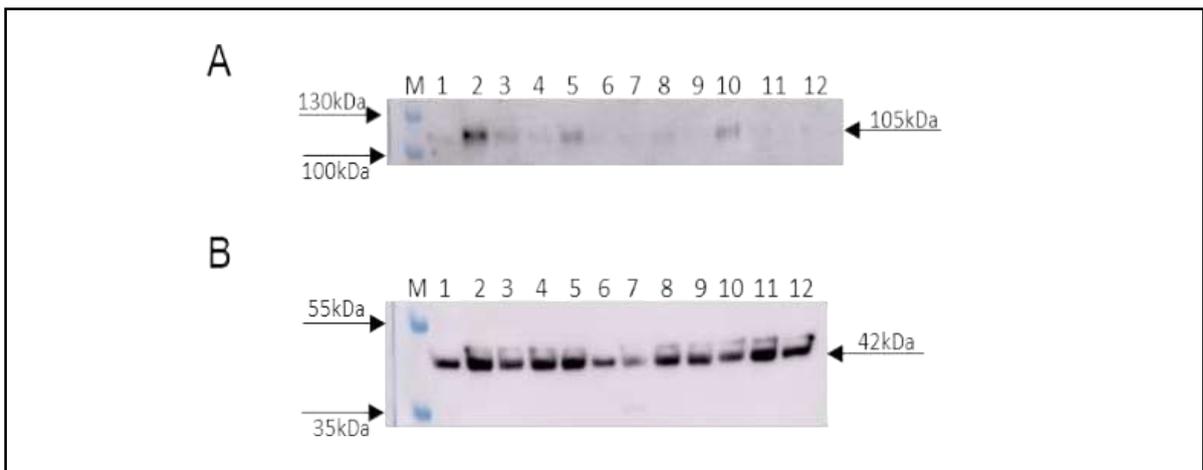


Figura 20 - Variação da expressão de AhR na linhagem de melanoma Sk-Mel147 após protocolo CRISPR-Cas9. Em A, a detecção do receptor aril de hidrocarbonetos (tamanho predito de 105 kDa) e em B detecção de beta-actina (42 kDa). Sendo que em M, marcador de peso molecular; em 1 a 3, *controle de melanoma transfetadas com lentCRISPRV2* na titulação da partícula lentiviral em 1:6; 4 a 6, amostras de *melanoma transfetadas com lentCRISPRV2* contendo a sequência guia 2 na titulação da partícula lentiviral em 1:6; 7 a 9, amostras de *melanoma transfetadas com lentCRISPRV2* contendo a sequência guia 1 na titulação da partícula lentiviral em 1:6; 10 a 12, amostras de Sk-Mel147 *wilde type* (selvagens). Marcadores de peso molecular foram mostrados nos painéis.

A figura 20 mostra uma incongruência entre as triplicatas biológicas selvagem, e as que receberam as partículas lentivirais controle ou contendo as sequências guias 1 e 2. Também durante estes testes, foi possível observar uma grande variação da expressão do receptor nos ensaios realizados (dados não mostrados aqui). Ainda, ao longo do aumento das passagens celulares submetidas ao protocolo CRISPR-Cas9, continuamos a não observar uma equivalência da marcação proteica de AhR, bem como observamos uma pequena recuperação na expressão do receptor nas amostras de linhagens anteriormente afirmadas como nocaute (figura 21).

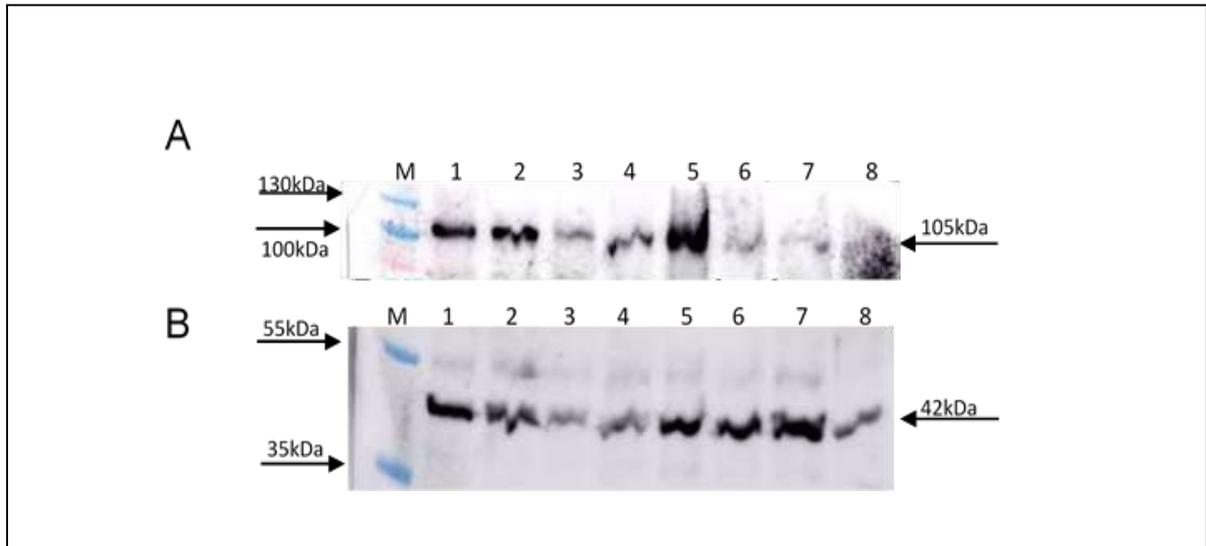


Figura 21 - Análise da recuperação do nocaute de AhR por *estern blotting* na linhagem de melanoma Sk-Mel147. Em A, a detecção do receptor aril de hidrocarbonetos (tamanho predito de 105kDa) e em B detecção de beta-actina (42kDa). Sendo que em M, marcador de peso molecular; em 1 e 2, amostras de Sk-Mel 147 *wilde type*; 3 e 4, *controle de melanoma transfectedas com lentCRISPRV2* na titulação da partícula lentiviral em 1:6; 5 e 6, amostras de *melanoma transfectedas com lentCRISPRV2* contendo a sequência guia 1 na titulação da partícula lentiviral em 1:6; 7 e 8, amostras de *melanoma transfectedas com lentCRISPRV2* contendo a sequência guia 2 na titulação da partícula lentiviral em 1:6. Marcadores de peso molecular foram mostrados nos painéis.

5.4 Discussão

Analisando os resultados deste capítulo e o objetivo do projeto, realizamos a padronização dos protocolos que compõem a ferramenta CRISPR-Cas9, sendo estes de transfecção das células empacotadoras e infecção das células alvo. As figuras 17 e 18 confirmam a eficiência da ferramenta CRISPR-Cas9 na edição gênica de AhR na linhagem de melanoma Sk-Mel147.

A ferramenta CRISPR-Cas9 é bastante eficiente na edição de genomas. A estratégia de aplicar como ferramenta de biologia molecular um sistema de corte e integração de pedaços de material genético encontrado em bactérias foi de relevância pró cenário científico ⁽¹¹²⁾. Nos anos 90, foi descoberto que uma quebra na dupla fita de DNA no local desejado era prevista para uma edição genômica de sucesso ⁽¹¹²⁾. Desta forma, a primeira estratégia foi o uso de nucleases “*zinc-finger*” (ZFNs). ZFNs são proteínas com domínios para ligação ao DNA pelos “dedos de zinco” e com um domínio de clivagem, retirados de uma enzima de restrição, que se liga e corta o DNA em determinada região. Entretanto, o desenvolvimento de proteínas ZFNs de alta especificidade no local do corte do genoma foi bastante

demorado. Em 2009, foram incorporadas ao contexto de edição genômica, proteínas ativadoras de transcrição, as TALEs, que usam um código de domínios precisos para específicos alvos de DNA. Contudo, mesmo com este aprimoramento, era necessária uma proteína para cada alvo ⁽¹¹²⁾.

Estas duas estratégias iniciais estão fortemente associadas a efeitos *off-target*, levando a possível rearranjo do genoma, o que limita a utilidade e a segurança destas enzimas nos genes ou mesmo quando empregadas na terapia celular. Uma vez que ocorra a formação do complexo da fita de RNA com a Cas9, tem-se a construção de uma endonuclease que cliva sequências específicas, produzindo extremidades “cegas” (*blunt*), induzindo modificação genética na célula. Este perfil é o encontrado na ferramenta CRISPR-Cas9, o que possibilita total edição do genoma, com apenas a troca da sequência guia ⁽¹¹³⁾.

As quebras de duplas fitas em extremidades “*blunt*” podem ser facilmente corrigidas, por processos de reparo endógeno, em células mamárias ⁽¹¹³⁾. Após quebra do DNA pela Cas9 no locus gênico, ambas as vias podem alcançar o reparo de edição: a NHEJ (via não homóloga de união final) e HDR (reparo dirigido a homologia), que difere basicamente à primeira por ocorrer na presença de uma sequência molde ⁽¹¹⁴⁾.

Durante a quebra da dupla fita pela Cas9, e na inexistência de uma sequência molde para o reparo, a via de reparo NHEJ é acionada. Desta forma, esta via de reparo permite o surgimento de mutações, deleções e inserções. Assim, estas modificações são aproveitadas para gerar nocautes, já que as alterações que ocorrem dentro de um éxon podem levar a mudança de códon, mediar deleções maiores no genoma e ainda a criação de “*stop códons*” (códon de parada) prematuros ⁽¹¹⁴⁾.

Uma vez que não realizamos ensaios que especificasse a modificação realizada pela nuclease no *locus* gênico do alvo, não podemos afirmar a assinatura genética da cultura celular. Assim, nossa cultura de células pode ser uma população mista em relação ao perfil genotípico de AhR, que sofreu reparo por ambas as vias clássicas citadas anteriormente. Desta forma, as múltiplas configurações podem ter conduzido a subpopulações genéticas distintas para AhR na mesma cultura, resultando inicialmente na apresentação negativa do receptor nos ensaios de expressão proteica (figura 18).

Sob esta ótica de análise do resultado apresentado na figura 18, hipotetizamos que após a infecção lentiviral a via de reparo NHEJ pode ter sido

ativada na maioria das células da cultura, conduzindo para uma menor expressão de AhR quando comparadas com o controle selvagem e com o controle da infecção. Em outras palavras, as amostras que receberam a partícula com a sequência guia 1 e 2 apresentaram reduzida expressão proteica do receptor nos ensaios de *western blotting*, nos levando a acreditar na obtenção do nocaute.

Como podemos observar na figura 19, esta modificação genotípica levou a uma mudança fenotípica na proliferação destas células. Esta alteração pode ser observada tanto pela alteração da morfologia celular, bem como pela alteração da confluência da cultura, mostrando uma mudança no padrão de crescimento da linhagem (dados não exibidos). Apesar de nossas especulações, deveríamos ter feito ensaios para discriminar a mudança morfológica observada na cultura, como por exemplo o ensaio de beta-galactosidase, avaliando a possibilidade de senescência celular. E que deveríamos ter analisado a assinatura genética da cultura. Contudo, é sabido da importância da participação do receptor na regulação da sinalização de fatores de crescimento que participam do processo de proliferação, pela regulação do ciclo celular, e também na sobrevivência ⁽¹¹⁵⁾. Desta forma, a diminuição da expressão do receptor afetou o crescimento da linhagem SK-Mel147.

Retomando a proposta de uma cultura celular mista geneticamente, acreditamos que uma pequena porção de células sofreu reparo da quebra de DNA pela via DHR. Desta forma, esta porção celular pode recompor a fita mediante sequência molde e, como consequência, manter a concentração proteica de AhR. Assim, estas células podem ter contribuído para a retomada do crescimento da cultura em detrimento da diminuição da subpopulação reparada pela via NHEJ. A subpopulação DHR pode ter proporcionado, mediante este comportamento proliferativo padrão, a confluência necessária para a realização dos testes mostrados na tabela 7 e resultado representado pela figura 20. Além disso, postulamos que a subpopulação reparada pela via DHR sustenta a retomada da expressão gênica observada na figura 21.

Nossos esforços em reproduzir e comprovar a obtenção do nocaute do receptor falharam, como pode ser observado pelos testes realizados na tabela 7. Diante disso, postulamos que associado a possibilidade de reparo da sequência pela via NHEJ e DHR mutuamente na cultura, conforme discutido acima, nossa incongruência na afirmação do nocaute pode estar associada a uma questão técnica. Muito embora o resultado pareça satisfatório inicialmente como visto na

figura 18, devido à dificuldade de uniformização das bandas referentes a expressão de AhR no ensaio de *western blotting*, não conseguimos validar a produção de linhagens editadas para o receptor. Assim, diante destes resultados, seria mais assertivo a análise da assinatura genética das culturas que receberam os diferentes guides, na tentativa de compreender melhor a causa das divergências dos ensaios de expressão proteica. Na ausência destes ensaios genéticos não podemos afirmar certamente se houve uma falha técnica como a perda de especificidade do anticorpo usado. Já que seguimos as etapas subsequentes a infecção lentiviral com uma população celular heterogênea.

Diante dos dados incongruentes de expressão de AhR durante os ensaios de *western blotting*, não afirmamos o sucesso na obtenção da edição gênica de AhR e apesar de nossas especulações mais ensaios devem ser feitos para comprovar nossas hipóteses.

Muito embora tenhamos obtido estes resultados negativos, a habilidade de induzir modificações em genomas e a criar organismos modelo através da CRISPR-Cas9 é promissora em estudos bioquímicos e aplicações biotecnológicas ⁽¹¹⁶⁾. Apesar de afirmarmos negativamente para o nocaute, o desenvolvimento do nocaute do receptor em outra linhagem através da metodologia de CRISPR-Cas9 pode ser satisfatório. De forma que este resultado pode ser inerente a linhagem SK-Mel147 escolhida como base de trabalho. AhR é possível de ser nocauteado em camundongos e modelo tumoral, como as células tumorais mamárias humanas MDA-MB-468. Estudos realizados mostraram que a perda do receptor está associada a uma diminuição da taxa de proliferação. Esta diminuição na proliferação, pode ser devido a formação de um complexo entre o receptor com a proteína pRb, resultando na modulação de efeitos relacionados ao ciclo celular de linhagens tumorais ⁽⁶⁷⁾. Apesar dos resultados mostrados aqui, acreditamos que silenciar AhR em outra linhagem pode apresentar resultado esperado.

O emprego da ferramenta CRISPR-Cas9 para obtenção de mutantes e nocautes de AhR em organismos considerados não modelo ⁽¹¹⁷⁾, além de *C. elegans*, “*zebrafish*”, leveduras e células de mamíferos ⁽¹¹⁸⁾, é empregada para obtenção de informações acerca das áreas da ecologia e bioquímica e fisiologia.

Capítulo III

O receptor aril de hidrocarbonetos e a identificação do ligante

O objetivo deste capítulo é avaliar a dimetiltryptamina como ligante de AhR em linhagens de melanoma mutadas para NRAS, realizando uma interseção entre os três pilares da tese: AhR e a identificação de seus ligantes associada a mutações no melanoma. E assim, inter-relacionar os capítulos II e III. Esta hipótese foi elaborada com base nos resultados anteriores do grupo que mostraram a possibilidade dos metabólitos do triptofano, da via das aminas-traço DMT e triptamina, desencadearem respostas anti e pró-tumorais em linhagens de melanoma SK-Mel19 e SK-Mel147 ⁽⁹⁶⁾. Além disso, o DMT não é explorado no contexto tumoral, sendo base de estudos relacionados a áreas da psiquiatria e comportamentais.

Diante disso, a obtenção da linhagem mutada para NRAS nocauteada para AhR, através da metodologia de CRISPR-Cas9, seria bastante interessante para agregar valor aos ensaios biológicos propostos de proliferação, invasão e migração, por exemplo. Assim, o capítulo II se conecta ao capítulo III, com a construção e uso da linhagem SK-Mel147 (mutada para NRAS - AhR^{-/-}) compondo as análises de bioinformática e ensaios biológicos.

Desta forma, realizamos inicialmente a análise do interactoma entre DMT e AhR. De acordo com os resultados obtidos, a próxima etapa consiste na análise de *docking* entre DMT e o receptor, e subsequentes ensaios biológicos com a linhagem nocaute do receptor. Apesar de não alcançarmos clareza e sucesso na confirmação do nocaute, como exposto no capítulo anterior, os resultados de interactoma mostrado a seguir são de extrema relevância para desencadear novas hipóteses e estratégias experimentais.

5.5 AhR e identificação de ligante

Inicialmente, realizamos o protocolo de síntese, estabelecido por Cameron (2018), que tem como produto o DMT em forma de sal (DMT-ácido fumárico (2:1)) conforme descrito em material e métodos. A escolha deste protocolo foi devido ao resultado final de síntese ser o DMT como um sal, o que garante precisão da determinação da concentração do material e por sua diluição em solução salina nos ensaios biológicos futuros, ao invés do uso de DMSO (dimetilsulfóxido). Problemas esses que foram destacados anteriormente em trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

O precipitado branco produzido (fluxograma; G), de aparência estrelada (detalhes não mostrados), foi encaminhado para análise de espectrometria de massas e ressonância magnética. O material sintetizado foi utilizado para identificação em GC/MS. Esta etapa foi realizada conforme descrito em material e métodos. O resultado do cromatograma mostrou um pico único (figura 22), mostrando que a pureza do sal produzido. No relatório de análise quantitativa, foi observado um pequeno pico no espectro contagem vs. massas-carga em 188.1m/z (de baixa resolução) e 189.0m/z (massa de alta resolução), evidenciando que com massa de 189g, provavelmente o produto tenha protonado (dados não mostrados).

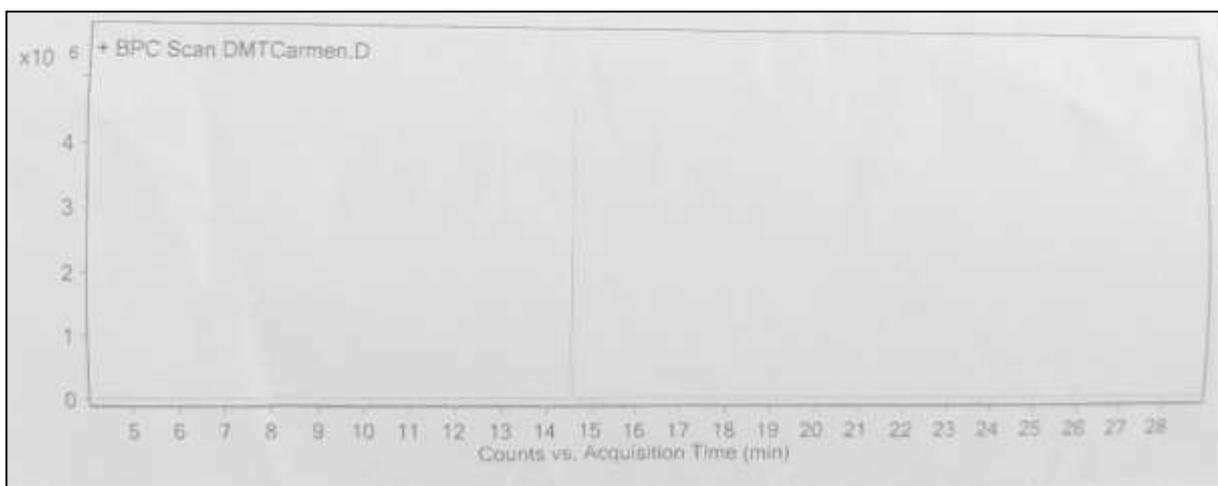


Figura 22 - Análise do DMT sintetizado. Cromatograma mostrando o pico único correspondente ao DMT produzido.

Os resultados da análise por RMN mostram que o produto sintetizado apresenta duas moléculas de DMT para uma de ácido fumárico, como pôde ser observado na figura 24 e 25. Diante da contagem dos picos, em ambas as análises

de H^1 e C^{13} , temos a comprovação da estrutura correspondente aos átomos que compõem a estrutura química do DMT (figura 23), conforme obtido de acordo com o protocolo de síntese seguido.

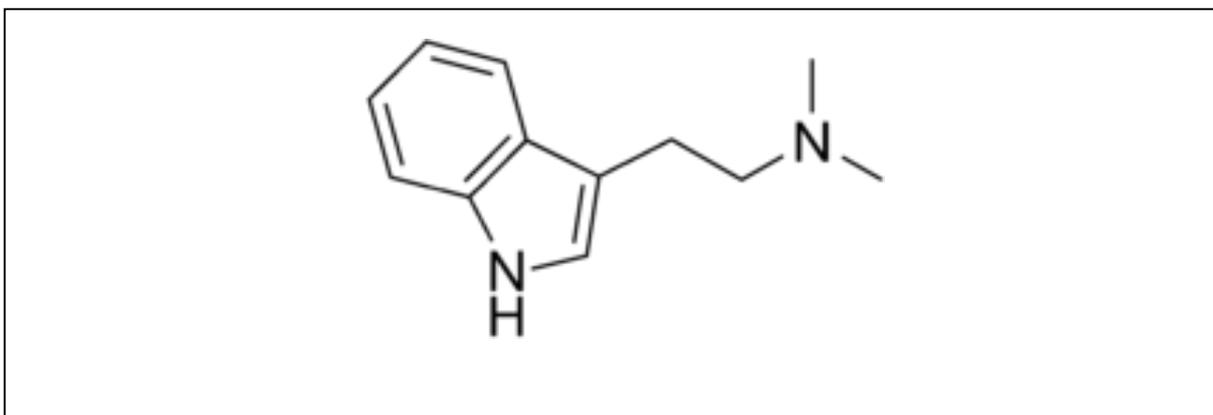


Figura 23 – Estrutura química da dimetiltryptamina. Tem como fórmula molecular $C_{12}H_{16}N_2$ e peso molecular de 188,27g.

O DMT sintetizado foi analisado por RMN em relação ao núcleo de H^1 (figura 24) e C^{13} (figura 25). Os resultados foram relatados em partes por milhão (ppm) e foram medidos em relação aos sinais para TMS (0,00 ppm). Dados são reportados como se segue: deslocamento químico (δ), multiplicidade, constante de acoplamento (J) em Hertz e intensidade integrada. As abreviações para denotar a multiplicidade de um sinal específico são: s (singleto), d (duplete), t (trigêmeo), q (quarteto) e, m (multiplete). Os resultados são reportados da seguinte maneira: 1H NMR (300 MHz, Methanol- d_4) δ 7.63 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.18 – 7.06 (m, 2H), 6.74 (s, 1H), 3.47 – 3.39 (m, 2H), 3.35 (s, 1H), 3.28 – 3.20 (m, 2H), 2.92 (s, 6H).

Para a análise de RMN da figura 24, é importante saber que cada número de sinais mostra quantos tipos diferentes de hidrogênio estão presentes na amostra. A localização dos sinais mostra como o núcleo de hidrogênio é ou não protegido. A intensidade do sinal mostra o número de hidrogênios do mesmo tipo e o desdobramento do sinal mostra o número de hidrogênios dos átomos adjacentes. Desta forma, seguindo a faixa de ppm de 0 a 9, observamos o pico que representa os hidrogênios da acetona contida na solução antes do resfriamento e formação do sólido branco. O próximo pico 2.92 (s, 6H) representa os dois grupos metil do DMT, fruto da dimetilação. Os picos 3.47 – 3.39 (m, 2H), 3.28 – 3.20 (m, 2H) representam

os hidrogênios anteriores ao radical metil, sendo que o pico 3.35 (s, 1H) retrata a protonação do produto de síntese. O pico próximo a 5ppm corresponde aos átomos de hidrogênio do ácido fumárico. O pico em 6.74 (s, 1H) refere-se ao hidrogênio ligado ao nitrogênio. E os demais picos, 7.63 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.40 (d, J =8.0 Hz, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.18 – 7.06 (m, 2H), estão relacionados aos hidrogênios do anel aromático.

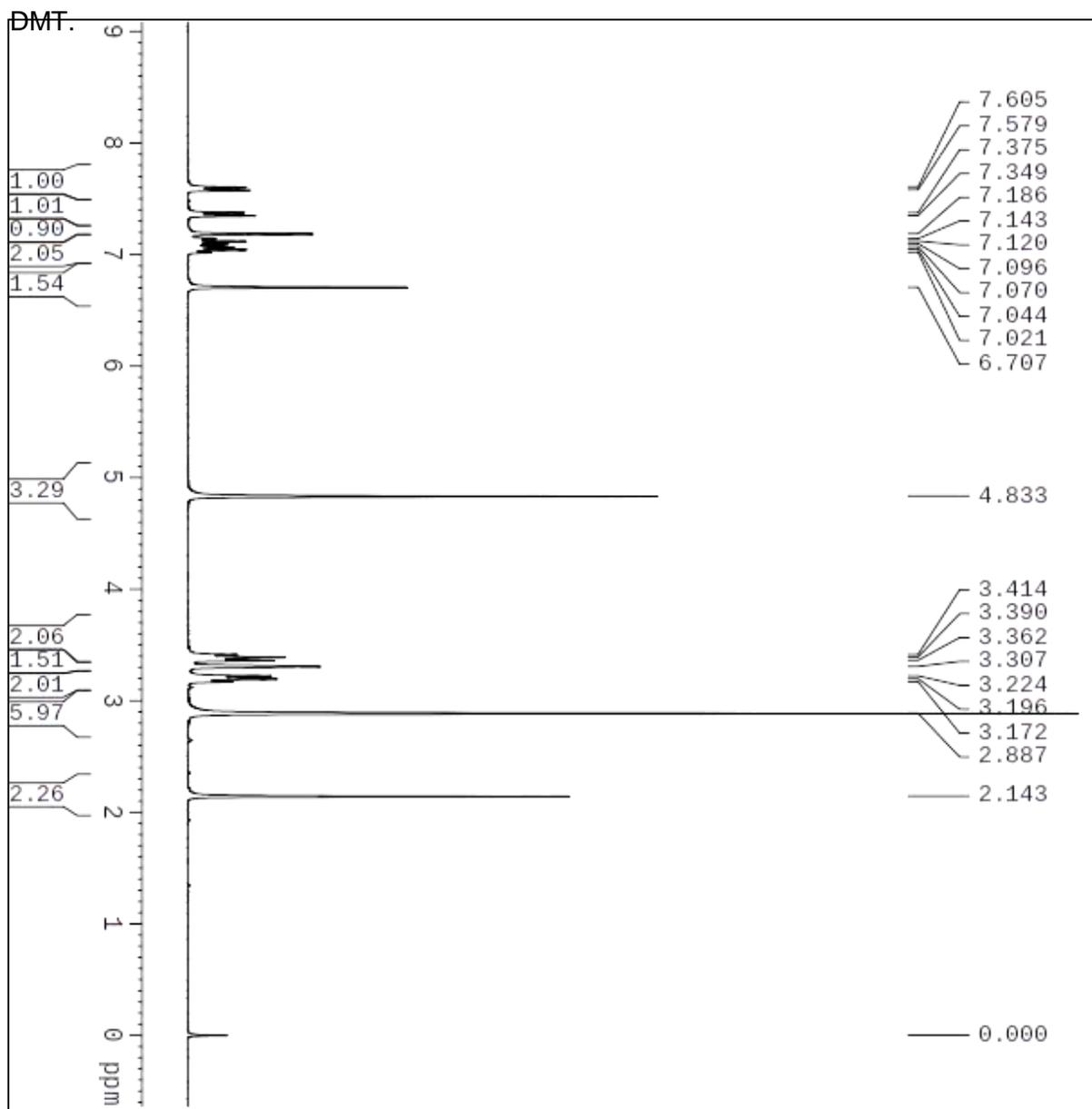


Figura 24 - Resultado da espectrometria de RMN do produto de síntese em relação ao núcleo H¹. A cada pico corresponde ao átomo que compõem a estrutura do DMT.

A faixa de deslocamento de deslocamento do carbono 13 é mais fraco que os do hidrogênio, variando de 0 a 220 ppm. Os picos próximos a 120 ppm referem-se

ao anel aromático e os picos próximos 50 ppm estão relacionados aos carbonos saturados, como o grupo metil.

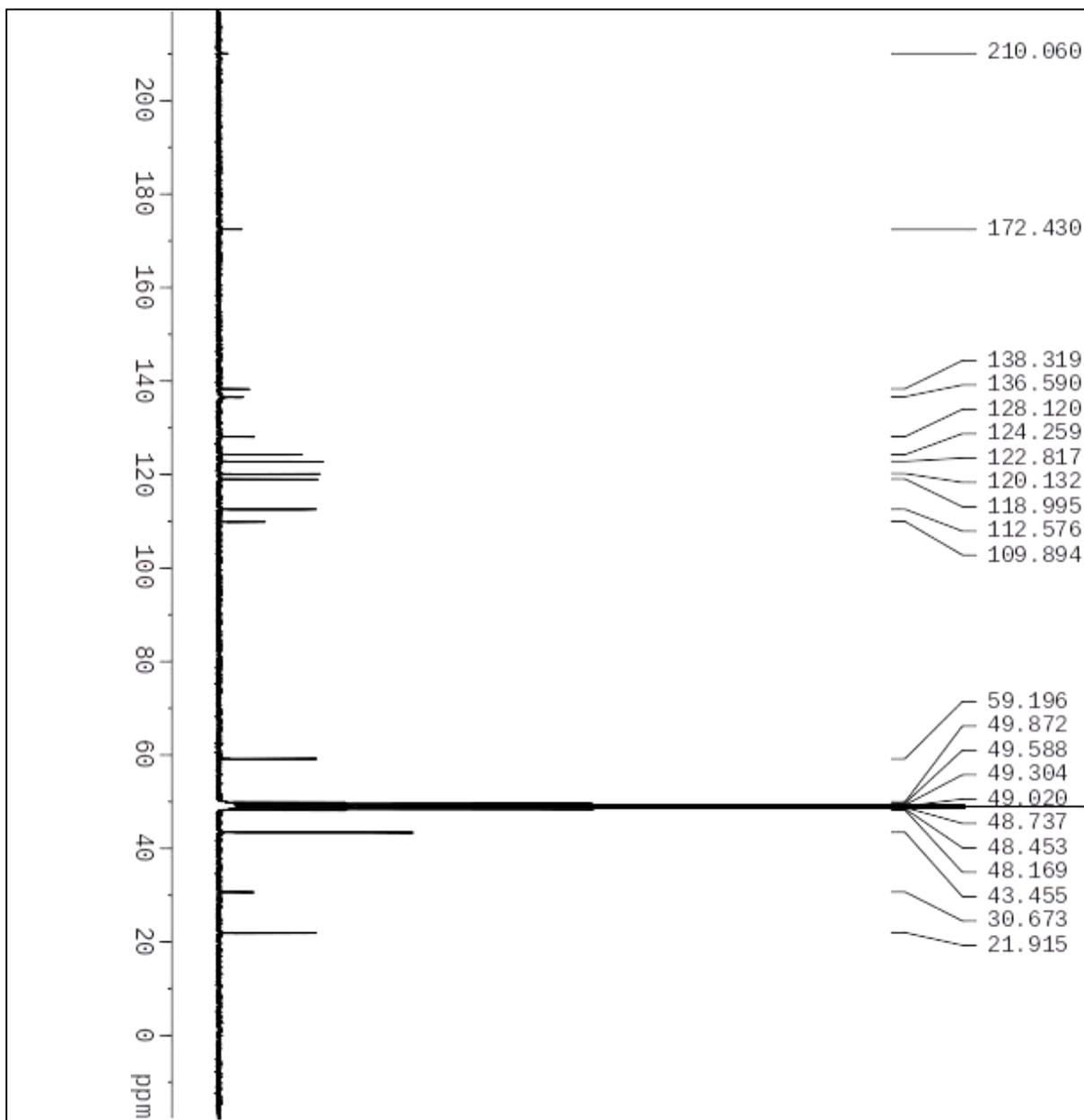


Figura 25 - Resultado da espectrometria de RMN do produto de síntese em relação ao núcleo C^{13} . A cada pico corresponde ao átomo que compõem a estrutura do DMT.

O DMT sintetizado foi quantificado com base em uma curva de concentração de DMT puro. Para isso, foi realizada uma curva de calibração de 1.5 a 400 ng/mL e os controles de qualidade a 160 ng/mL e 320 ng/mL (variação aceitável de +- 15%). Em seguida, foi preparada uma solução do DMT sintetizado a 1 mg/mL (solução A)

e essa solução passou por uma diluição seriada em quatro etapas para que chegasse a 250 ng/mL (teoricamente). Os valores de amostra foi de 117,4 ng/mL. Ao quantificar a solução A, após corrigir pelo fator de diluição, a concentração encontrada foi 0,47 mg/mL, com exatidão de 47%.

O interactoma foi realizado em colaboração conforme mencionado em material e métodos, e preliminarmente utilizamos a ferramenta STRING ⁽¹¹⁹⁾ e em seguida a STITCH ⁽¹²⁰⁾. Inicialmente, nossa estratégia era avaliar a possibilidade de interação entre DMT e AhR e posteriormente realizar a análise de *docking*, caso esta interação fosse possível. O interactoma indicou que o receptor aril não interage com a dimetiltryptamina, diretamente, nas linhagens mutadas para NRAS. Como podemos ver, na figura 26, o DMT (“*psychogenic*”) não interage com as proteínas testadas (o que é visto pela ausência de traços unindo a proteína ao alvo).

Além disso, estes ensaios mostram que o AhR pode ter relação com as demais proteínas de destaque no contexto tumoral, participante de processos tumorigênicos, como BRAF.

A análise derivada do interactoma possibilitaram visualizar as interações preditas para o DMT (figura 27). A figura 27 retrata as possíveis interações do DMT. Destaco a interação direta com o receptor intracelular sigma não haploide 1 (SIGMAR1) dentre os AYP (vasopressina arginina), HTR2B (5-hidroxitriptamina receptor 2B acoplado a proteína G), HTR6 (5-hidroxitriptamina receptor 6 acoplado a proteína G), HTR2A (5-hidroxitriptamina receptor 2A acoplado a proteína G), HTR1A (5-hidroxitriptamina receptor 1A acoplado a proteína G), HTR1D (5-hidroxitriptamina receptor 2A acoplado a proteína G), HTR2C (5-hidroxitriptamina receptor 2C acoplado a proteína G), PNKD (disquinésia não quinesigênico paroxismal), THAP1 (proteína 1 associado a apoptose contendo domínio THAP).

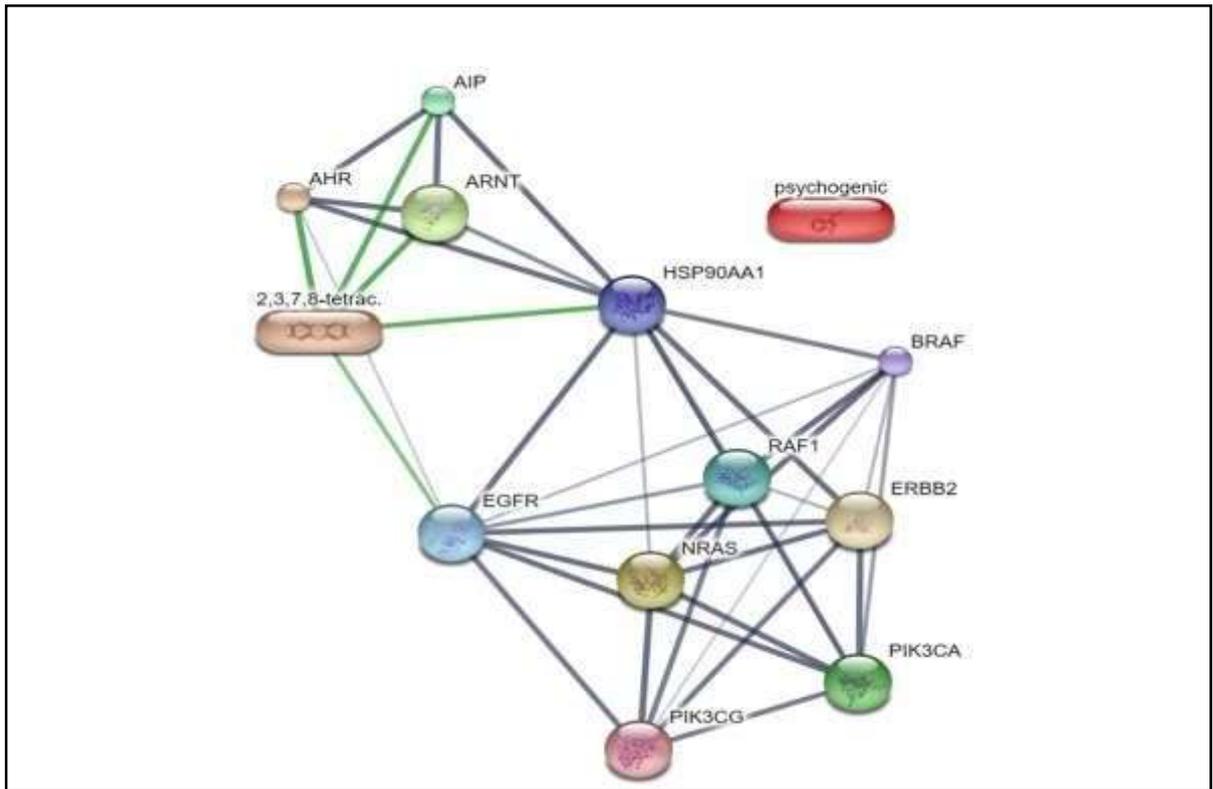


Figura 26 - Análise de bioinformática (interactoma) de AhR e DMT. A imagem mostra que DMT (*“psychogenic”*) não interage com o receptor aril de hidrocarbonetos, e seu translocador e as demais proteínas AIP, HSP90AA1 (proteína de choque térmico HSP 90-alpha), BRAF, RAF1 (RAF proto-oncogene serina/treonina-proteína quinase), NRAS, EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), ERBB2 (receptor tirosina-proteína quinase erbB-2), PIK3CA (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa - p110 α), PIK3CG (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3 quinase subunidade catalítica gama). Entretanto, o receptor aril interage com 2,3,7-8 tetraclorodibenzeno, um agonista clássico. As interações podem ser visualizadas pelas conexões em barras.

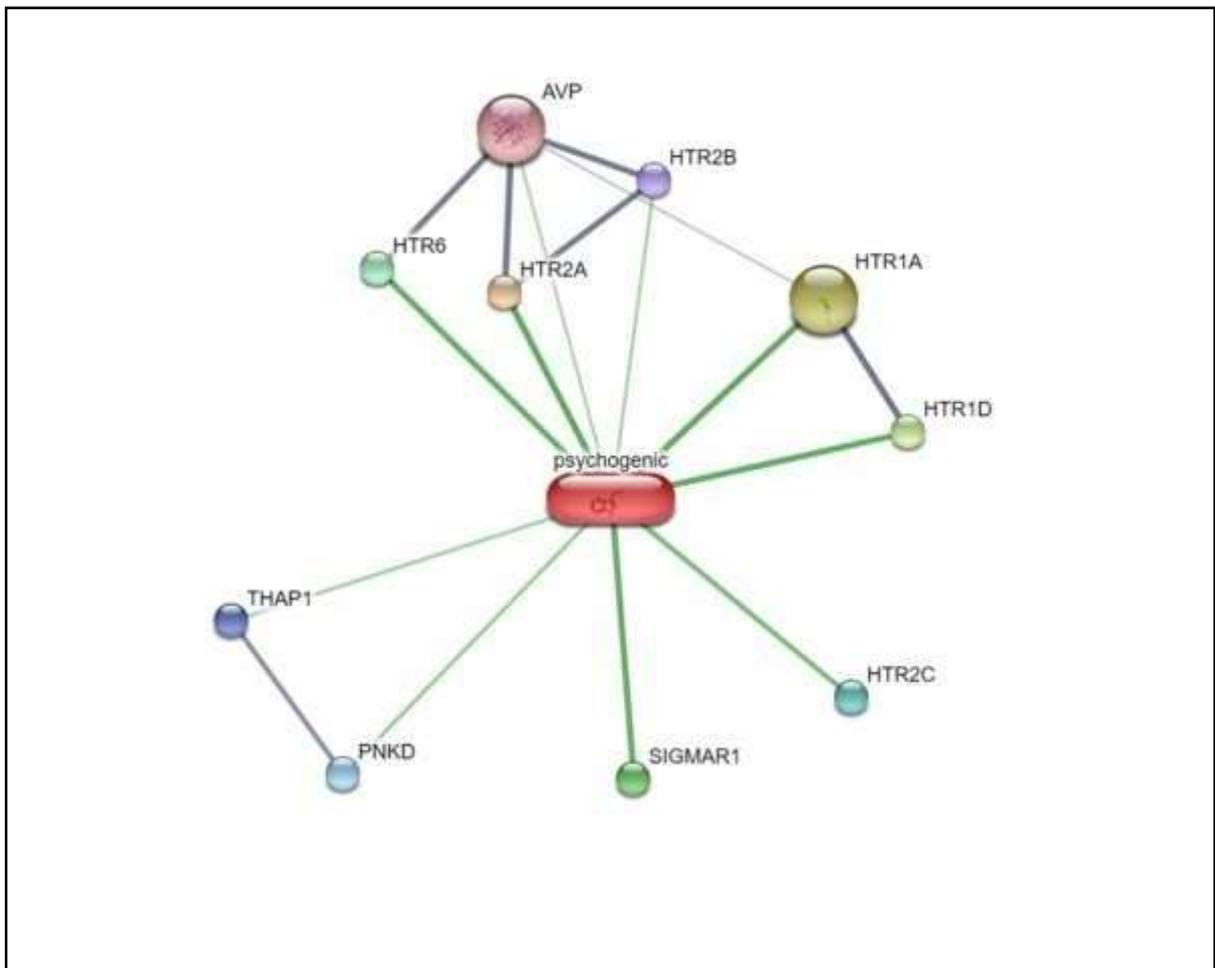


Figura 27 - Interações preditas de DMT. A imagem mostra que DMT (*psychogenic*) interage com as proteínas AYP (vasopressina arginina), HTR2B (5-hidroxitriptamina receptor 2B acoplado a proteína G), HTR6 (5-hidroxitriptamina receptor 6 acoplado a proteína G), HTR2A (5-hidroxitriptamina receptor 2A acoplado a proteína G), HTR1A (5-hidroxitriptamina receptor 1A acoplado a proteína G), HTR1D (5-hidroxitriptamina receptor 2A acoplado a proteína G), HTR2C (5-hidroxitriptamina receptor 2C acoplado a proteína G), SIGMAR1 (receptor intracelular sigma não haploide 1), PNKD (disquinésia não quinesigênico paroxismal), THAP1 (proteína 1 associada a apoptose contendo domínio THAP). As interações podem ser visualizadas pelas conexões das barras.

5.6 Discussão

O protocolo de síntese testado é de fácil execução e apresentou resultados muito satisfatórios quanto a produção do DMT: ácido fumárico em forma de sal. As análises de RMN e em espectrometria de massas nos certificaram o produto de síntese, quanto a pureza e estrutura do DMT.

Conforme descrito nos resultados acima, a quantificação da solução A, após corrigir pelo fator de diluição, teve concentração de 0,47 mg/mL quando o esperado era um valor próximo a 1,0 mg/mL. Acreditamos que esta diferença pode ser devido

ao DMT estar associado ao ácido fumárico, conforme o produto de síntese descrito no protocolo de Cameron e colaboradores (2018). O fato do produto de síntese ter a presença do ácido fumárico, pode ter interferido na quantificação mais refinada do produto. E que diante da estrutura do sal ser composta por duas moléculas de DMT para uma de ácido fumárico, pode ser necessário a adição de algum fator de correção para a quantificação correta do DMT, e seu uso futuro em ensaios biológicos. Devido à ausência de confirmação sobre a produção de linhagens nocaute para o receptor não utilizamos o produto de síntese em ensaios biológicos, que tinham por objetivo completar as análises *in silico* da possível mediação de efeitos anti ou pró-tumorais derivados da associação DMT-AhR nas linhagens de melanoma.

O interactoma foi realizado em colaboração conforme mencionado em material e métodos com o objetivo de elucidar *in silico* se o AhR interagia diretamente com DMT nas linhagens mutadas para NRAS. A análise de bioinformática mostrou que o receptor aril não interage com a dimetiltriptamina (“*psychogenic*”) diretamente, nas linhagens mutadas para NRAS (figura 26), o que é visto pela ausência de traços unindo a proteína a este. Na literatura não foi encontrado nenhum resultado de busca que informe a interação direta de AhR com DMT em linhagem de melanoma, tornando este resultado inédito.

Ainda, podemos observar que o AhR interage com as proteínas AIP, HSP90. Estas proteínas compõem o complexo proteico ao qual o receptor encontra-se em sua forma inativa no citoplasma ^(41,43). Além disso, a análise reforça a interação de TCDD como ligante direto do receptor ⁽⁴⁴⁾.

O AhR pode ter interação com as demais proteínas de destaque no contexto tumoral, participante de processos tumorigênicos, como BRAF, RAF1 (RAF proto-oncogene serina/treonina-proteína quinase, também conhecida como proto-oncogene c-RAF ou c-Raf ou ainda Raf-1), ERBB2 (receptor tirosina-proteína quinase erbB-2, também conhecida como CD340 (conjunto de diferenciação 340), ou proto-oncogene Neu), EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), NRAS, PI3KCA (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa - p110 α), PIK3CG (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3 quinase subunidade catalítica gama). Este resultado agrega a discussão apresentada anteriormente no capítulo 1.

O interactoma também possibilitou visualizar as interações preditas para DMT (figura 27). Dentre as possíveis interações do DMT, têm-se destaque a interação direta com o receptor intracelular sigma não haplóide 1 (SIGMAR1) e os subtipos

dos receptores de serotonina (HTR2B, 5-hidroxitriptamina receptor 2B acoplado a proteína G; HTR6, 5-hidroxitriptamina receptor 6 acoplado a proteína G; HTR2A, 5-hidroxitriptamina receptor 2A acoplado a proteína G; HTR1A, 5-hidroxitriptamina receptor 1A acoplado a proteína G; HTR1D, 5-hidroxitriptamina receptor 2A acoplado a proteína G; HTR2C, 5-hidroxitriptamina receptor 2C acoplado a proteína G), dentre os demais AVP (vasopressina arginina), PNKD (discinésia não cinesiogênica paroxismal) e THAP1 (proteína 1 associado a apoptose contendo domínio THAP).

Os receptores sigma, descobertos em 1976, caracterizados inicialmente como receptores opióides, podem modular fenômenos de sobrevivência celular, excitabilidade e diversas outras funções no corpo humano ⁽¹²¹⁾. Os dois subtipos deste receptor são distribuídos em diferentes tecidos e apresentam distintos papéis na fisiologia e farmacologia, como a regulação da proliferação celular e sobrevivência (inibição da apoptose) além de exercer papel crucial na progressão e no desenvolvimento tumoral. ⁽¹²²⁾

O subtipo 1 (σ_1 - sigma 1) é ubiqüitaneamente expresso e apresenta 3 domínios hidrofóbicos, sendo dois destes hélices transmembrana com um loop extracelular próximo a região C-terminal. Localiza-se na interface do retículo endoplasmático com a mitocôndria regulando a sinalização entre estas duas organelas e o *croostalk* entre o núcleo e o retículo endoplasmático. Já o subtipo 2 (σ_2 - sigma 2) tem sua localização restrita a mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana plasmática. Ambos subtipos são amplamente distribuídos no sistema nervoso central, mas também em órgãos periféricos, como fígado, coração, ovário e rim por exemplo ⁽¹²²⁾.

Tradicionalmente estudado em questões relacionadas ao comportamento, estresse e doenças psíquicas, recentes estudos vêm relacionando o receptor a biologia tumoral e ao desenvolvimento de novas drogas contra o câncer ⁽¹²²⁾.

Os receptores sigma tem expressão significativa em melanomas malignos e demais tipos de tumores, como de mama, pulmão, cérebro entre outros, e devido a isto tem crescido o número de estudos acerca de seus agonistas e antagonistas visando aspectos terapêuticos ⁽¹²³⁾. Embora tenha artigos mostrando a semelhança das respostas dos receptores sigma dependente do ligante, há estudos mostrando que os receptores sigma produzem, dependente do ligante, efeitos farmacológicos contrários a apoptose e autofagia de melanoma uveal. De acordo com os resultados de Longhitano e seus colaboradores (2017), o receptor sigma 2 é relacionado com a

inibição da proliferação de células cancerígenas enquanto o receptor sigma 1, ativado pelo ligante, aumenta a proliferação celular ⁽¹²⁴⁾.

É sabido que o receptor sigma 1 tem como ligantes compostos endógenos que apresentem estrutura alquilamina, como o DMT ^(125,126). Entretanto não se sabe ao certo como essa associação ocorre, já que a constante de dissociação (K_d) do DMT encontrada *in vivo* é muito maior que a necessária para ativação do receptor ⁽¹²⁵⁾. Ainda há autores que divergem desta afirmação apontando para a capacidade do DMT ser acumulado em vesículas e desta forma atingir altas concentrações ⁽¹²⁷⁾.

O DMT também é ligante endógeno do receptor de serotonina, sendo agonista do subtipo 5-HT_{2A} ⁽¹²⁸⁾. O DMT regula processos imunes e a proliferação tumoral, já que os receptores de serotonina também se encontram presentes em muitas células imunes, juntamente com os receptores sigma. Agonistas destes receptores sigma são capazes de desencadear sinalização que culminam na redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias. Desta forma, o DMT pode ter influência no sistema imune através dos efeitos mediados por 5-HT_{2A}. Estudos mostraram que o DMT, administrado através da ingestão da ayahuasca, foi capaz de aumentar o número de células *natural killer* (NK) circulante na corrente sanguínea. Em análises *in vitro*, o DMT promoveu o aumento do nível de interferon-gama e interferon-beta secretado em culturas de células NK e células dendríticas. Sabendo que o interferon pode atuar como fatores antitumorais, pode-se inferir que o DMT pode modular o sistema imune contribuindo para a eliminação de células malignas. O desenvolvimento de terapias farmacológicas tendo como base o interferon são estudadas e somado a isto, o DMT pode ser algo promissor a ser futuramente estudado ⁽¹²⁹⁾.

Somado a esta discussão, nosso resultado sugere a interação de DMT ao receptor sigma 1, e não ao receptor aril de hidrocarbonetos. Para certificar este resultado análises de *docking* associados a ensaios biológicos, avaliando o papel do receptor, devem ser realizados para averiguar a afinidade e seletividade de DMT como ligante do receptor na linhagem de melanoma.

As demais possíveis interações de DMT, PNKD e THAP1, estão relacionadas a distúrbios neurológicos de movimento. Apesar de menor possibilidade de interação (retas mais finas apresentadas na figura 27) a PNKD (discinesia não cinesiogênica paroxismal) é um tipo de discinesia que se caracteriza por desordem do movimento, que acomete principalmente na infância. A doença pode estar relacionada a desvios metabólicos ou a falha da supressão da inibição dos interneurônios gabaérgicos ⁽¹³⁰⁾. Acreditamos que PNKD interage com THAP1 devido a correlação com as distonias heterogeneamente hereditárias ⁽¹³¹⁾.

A seguinte possível interação do DMT é com a proteína THAP1, que também tem relevância em casos de distúrbios de movimentos, como as distonias. Dentre as causas genéticas pode-se destacar as mutações no gene que codifica THAP1. Esta proteína tem 3 domínios, o localizado na região N-terminal, que atua como uma “*zinc finger*” conferindo ligação ao DNA, um domínio central que é rico em prolina e um C-terminal que contém um sinal de localização nuclear, podendo assim atuar como um fator de transcrição ⁽¹³²⁾.

A fisiopatologia deste distúrbio pode estar relacionada à ação de THAP1 como fator de transcrição, regulando a expressão de proteínas que participam do processamento dos subtipos de receptores dopaminérgicos. Estes receptores são transportados até a membrana celular através das vesículas produzidas pelo complexo de Golgi e assim interagem com proteínas G levando ao aumento ou diminuição do mensageiro AMPc (3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico) ⁽¹³²⁾. Associado a isto, sabe-se que sigma 1 pode atuar como chaperona, localizada no retículo endoplasmático, regulando vários processos dependendo do tipo do ligante. E que sigma 1 é um regulador da neurotransmissão de dopamina ⁽¹³³⁾.

Na tentativa de fazer um exercício de correlação, nós hipotetizamos que o DMT, agonista de sigma 1, ativa este receptor. Em consequência, sigma 1 atua como chaperona no retículo endoplasmático de células neuronais, regulando os subtipos dos receptores de dopamina na membrana celular.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados apontam para um aumento de expressão de AhR e sua importância nas fases de desenvolvimento do melanoma. A maior expressão de AhR encontrada entre as linhagens de melanoma quando comparadas ao melanócito demonstra a participação do receptor nos processos iniciais de formação tumoral. O *up regulation* de AhR, observado na análise da plataforma *CbioCancer Center Genomics Portal*, corrobora com a importância do papel de AhR no processo tumorigênico.

O aumento da expressão de AhR também foi visto entre linhagens derivadas da fase de desenvolvimento primário e metastática, além do aumento de AhR em amostra de pacientes derivadas de melanoma de crescimento vertical. Estes dados remetem para a relação do receptor em processos de migração, invasão celular e metástase.

Além disso, o AhR pode ser marcador de resistência tumoral em linhagens de melanoma mutadas para BRAF^{V600E}, uma vez que observamos os maiores valores de mRNA de AhR em linhagens resistentes quando comparada às parentais.

Nossos resultados do interactoma suportam a hipótese que DMT não é um ligante de AhR. Nossas análises, associadas aos dados anteriores do grupo (dados não mostrados) apontam para outro receptor como mediador dos efeitos biológicos, em destaque para o receptor sigma 1.

7. REFERÊNCIAS

1. Netscher DT, Leong M, Orengo I, Yang D, Berg C, Krishnan B. Cutaneous malignancies: melanoma and nonmelanoma types. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(3):37e–56e. doi:10.1097/PRS.0b013e318206352b
2. (INCA). Instituto Nacional do Câncer. Tipos de Câncer. Câncer de pele Melanoma. Rio de Janeiro- RJ: MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2020. Acesso: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>
3. (INCA) IN de CJAG da S, Flama. Estimativa/2016. Incidência de Câncer no Brasil. Divisão de. Rio de Janeiro - RJ: MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2016.
4. Kaufman HL, Mehnert JM, organizadores. Melanoma [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 18 de fevereiro de 2020]. (Cancer Treatment and Research; vol. 167). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22539-5>
5. Flach EH, Rebecca VW, Herlyn M, Smalley KS, Anderson AR. Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Mol Pharm* [Internet]. 2011/11/10. 2011;8(6):2039–49. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22067046
6. Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2001/09/26. 2001;125(10):1295–306. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11570904
7. Potrony M, Badenas C, Aguilera P, Puig-Butille JA, Carrera C, Malveyh J, et al. Update in genetic susceptibility in melanoma. *Ann Transl Med* [Internet]. 2015/10/22. 2015;3(15):210. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=26488006
8. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. junho de 2016;16(6):345–58.
9. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med*. 6 de julho de 2006;355(1):51–65.
10. Day C-P, Marchalik R, Merlino G, Michael H. Mouse models of UV-induced melanoma: genetics, pathology, and clinical relevance. *Lab Invest*. junho de 2017;97(6):698–705.
11. Swick JM, Maize JC. Molecular biology of melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. novembro de 2012;67(5):1049–54.
12. Acosta AM, Kadkol SS. Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in

Cutaneous Melanoma: An Updated Review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. novembro de 2016;140(11):1290–6.

13. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. *Endocrine Reviews*. 1º de abril de 2001;22(2):153–83.
14. Romano E, Schwartz GK, Chapman PB, Wolchock JD, Carvajal RD. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *The Lancet Oncology*. setembro de 2011;12(9):913–22.
15. Chiappetta C, Proietti I, Soccodato V, Puggioni C, Zaralli R, Pacini L, et al. BRAF and NRAS Mutations are Heterogeneous and Not Mutually Exclusive in Nodular Melanoma: Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. março de 2015;23(3):172–7.
16. Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, et al. Raf Family Kinases: Old Dogs Have Learned New Tricks. *Genes & Cancer*. 1º de março de 2011;2(3):232–60.
17. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob J-J, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*. dezembro de 2012;10(1):85.
18. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med*. novembro de 2013;19(11):1401–9.
19. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. fevereiro de 2007;445(7130):851–7.
20. Fernandez-Medarde A, Santos E. Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer*. 1º de março de 2011;2(3):344–58.
21. Queirolo P, Spagnolo F. Binimetinib for the treatment of NRAS-mutant melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2 de novembro de 2017;17(11):985–90.
22. Muñoz-Couselo E, Zamora Adelantado E, Ortiz Vélez C, Soberino-García J, Perez-Garcia JM. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. *OTT*. agosto de 2017;Volume 10:3941–7.
23. Inamdar GS, Madhunapantula SV, Robertson GP. Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochemical Pharmacology*. setembro de 2010;80(5):624–37.
24. Krayem M, Journe F, Wiedig M, Morandini R, Sales F, Awada A, et al. Prominent role of cyclic adenosine monophosphate signalling pathway in the sensitivity of WT BRAF/WT NRAS melanoma cells to vemurafenib. *European Journal of Cancer*. maio de 2014;50(7):1310–20.

25. Arozarena I, Wellbrock C. Overcoming resistance to BRAF inhibitors. *Ann Transl Med.* outubro de 2017;5(19):387–387.
26. Peuvrel L, Quéreux G, Saint-Jean M, Brocard A, Nguyen JM, Khammari A, et al. Profile of vemurafenib-induced severe skin toxicities. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* fevereiro de 2016;30(2):250–7.
27. Smalley KSM, Sondak VK. Melanoma — An Unlikely Poster Child for Personalized Cancer Therapy. *N Engl J Med.* 26 de agosto de 2010;363(9):876–8.
28. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature.* dezembro de 2010;468(7326):968–72.
29. Romano E, Pradervand S, Paillusson A, Weber J, Harshman K, Muehlethaler K, et al. Identification of Multiple Mechanisms of Resistance to Vemurafenib in a Patient with BRAFV600E-Mutated Cutaneous Melanoma Successfully Rechallenged after Progression. *Clinical Cancer Research.* 15 de outubro de 2013;19(20):5749–57.
30. Simeone E, Grimaldi AM, Festino L, Vanella V, Palla M, Ascierto PA. Combination Treatment of Patients with BRAF-Mutant Melanoma: A New Standard of Care. *BioDrugs.* fevereiro de 2017;31(1):51–61.
31. Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Fung C, Hyman J, et al. BRAF Inhibitor Resistance Mechanisms in Metastatic Melanoma: Spectrum and Clinical Impact. *Clinical Cancer Research.* 1º de abril de 2014;20(7):1965–77.
32. Spain L, Julve M, Larkin J. Combination dabrafenib and trametinib in the management of advanced melanoma with BRAFV600 mutations. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 2 de maio de 2016;17(7):1031–8.
33. Welsh SJ, Rizos H, Scolyer RA, Long GV. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? *European Journal of Cancer.* julho de 2016;62:76–85.
34. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I – Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European Journal of Cancer.* março de 2017;73:85–92.
35. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. MAPK pathway in melanoma part II—secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European Journal of Cancer.* março de 2017;73:93–101.
36. Antonsson B, Martinou J-C. The Bcl-2 Protein Family. *Experimental Cell Research.* abril de 2000;256(1):50–7.

37. Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution¹¹Invited review for Chemico-Biological Interactions. Chemico-Biological Interactions. setembro de 2002;141(1–2):131–60.
38. Hahn ME, Karchner SI, Merson RR. Diversity as opportunity: Insights from 600 million years of AHR evolution. Current Opinion in Toxicology. fevereiro de 2017;2:58–71.
39. Karchner SI, Franks DG, Powell WH, Hahn ME. Regulatory Interactions among Three Members of the Vertebrate Aryl Hydrocarbon Receptor Family: AHR Repressor, AHR1, and AHR2. J Biol Chem. 1º de março de 2002;277(9):6949–59.
40. Yasui T, Kim E-Y, Iwata H, Franks DG, Karchner SI, Hahn ME, et al. Functional Characterization and Evolutionary History of Two Aryl Hydrocarbon Receptor Isoforms (AhR1 and AhR2) from Avian Species. Toxicological Sciences. 4 de junho de 2007;99(1):101–17.
41. Abel J, Haarmann-Stemmann T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. Biological Chemistry [Internet]. 1º de novembro de 2010 [citado 22 de fevereiro de 2020];391(11). Disponível em: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2010.391.issue-11/bc.2010.128/bc.2010.128.xml>
42. Flaveny C. Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity. Mol Cell Pharmacol. 4 de agosto de 2009;1(3):119–23.
43. Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix–loop–helix/PAS family of transcriptional regulators. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. fevereiro de 2004;36(2):189–204.
44. Denison MS, Heath-Pagliuso S. The Ah Receptor: A Regulator of the Biochemical and Toxicological Actions of Structurally Diverse Chemicals. Bull Environ Contam Toxicol. novembro de 1998;61(5):557–68.
45. Swanson HI. DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. Chemico-Biological Interactions. setembro de 2002;141(1–2):63–76.
46. Hankinson O. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. Archives of Biochemistry and Biophysics. janeiro de 2005;433(2):379–86.
47. Pollenz RS. The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation. Chemico-Biological Interactions. setembro de 2002;141(1–2):41–61.
48. Ma Q, Baldwin KT. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo- p -dioxin-induced Degradation

of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) by the Ubiquitin-Proteasome Pathway: ROLE OF THE TRANSCRIPTION ACTIVATION AND DNA BINDING OF AhR. *J Biol Chem.* 24 de março de 2000;275(12):8432–8.

49. Tian J, Feng Y, Fu H, Xie HQ, Jiang JX, Zhao B. The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Key Bridging Molecule of External and Internal Chemical Signals. *Environ Sci Technol.* 18 de agosto de 2015;49(16):9518–31.
50. Heath-Pagliuso S, Rogers WJ, Tullis K, Seidel SD, Ceniñ PH, Brouwer A, et al. Activation of the Ah Receptor by Tryptophan and Tryptophan Metabolites †. *Biochemistry.* agosto de 1998;37(33):11508–15.
51. Rannug A, Fritsche E. The aryl hydrocarbon receptor and light. *Biological Chemistry [Internet].* 1º de janeiro de 2006 [citado 22 de fevereiro de 2020];387(9). Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/bchm.2006.387.issue-9/bc.2006.143/bc.2006.143.xml>
52. Opitz CA, Litzemberger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* outubro de 2011;478(7368):197–203.
53. DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, Flaveny CA, Lahoti TS, Laurenzana EM, et al. Kynurenic Acid Is a Potent Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand that Synergistically Induces Interleukin-6 in the Presence of Inflammatory Signaling. *Toxicological Sciences.* maio de 2010;115(1):89–97.
54. Kawasaki H, Chang H-W, Tseng H-C, Hsu S-C, Yang S-J, Hung C-H, et al. A tryptophan metabolite, kynurenine, promotes mast cell activation through aryl hydrocarbon receptor. *Allergy.* abril de 2014;69(4):445–52.
55. Brooks J, Eltom SE. Malignant transformation of mammary epithelial cells by ectopic overexpression of the aryl hydrocarbon receptor. *Curr Cancer Drug Targets.* junho de 2011;11(5):654–69.
56. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the CYP1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer. *J Biol Chem.* 4 de junho de 2004;279(23):23847–50.
57. Wincent E, Kubota A, Timme-Laragy A, Jönsson ME, Hahn ME, Stegeman JJ. Biological effects of 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) in vivo are enhanced by loss of CYP1A function in an Ahr2-dependent manner. *Biochemical Pharmacology.* junho de 2016;110–111:117–29.
58. Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochemical Pharmacology.* janeiro de 2000;59(1):65–85.
59. Shertzer HG, Genter MB, Talaska G, Curran CP, Nebert DW, Dalton TP. 7H-

dibenzo[c,g]carbazole metabolism by the mouse and human CYP1 family of enzymes. *Carcinogenesis*. 18 de janeiro de 2007;28(6):1371–8.

60. Marshall NB, Kerkvliet NI. Dioxin and immune regulation: Emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the generation of regulatory T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. janeiro de 2010;1183(1):25–37.
61. Hanieh H. Toward Understanding the Role of Aryl Hydrocarbon Receptor in the Immune System: Current Progress and Future Trends. *BioMed Research International*. 2014;2014:1–14.
62. Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. The aryl hydrocarbon receptor: a multifunctional chemical sensor for host defense and homeostatic maintenance. *Exp Anim*. 2017;66(2):75–89.
63. Furue M, Takahara M, Nakahara T, Uchi H. Role of AhR/ARNT system in skin homeostasis. *Arch Dermatol Res*. novembro de 2014;306(9):769–79.
64. Stevens EA, Mezrich JD, Bradfield CA. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology*. julho de 2009;127(3):299–311.
65. Romani L, Zelante T, Luca AD, Iannitti RG, Moretti S, Bartoli A, et al. Microbiota control of a tryptophan-AhR pathway in disease tolerance to fungi: Highlights. *Eur J Immunol*. novembro de 2014;44(11):3192–200.
66. Smith BW, Rozelle SS, Leung A, Ubellacker J, Parks A, Nah SK, et al. The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic progenitor cell expansion and differentiation. *Blood*. 18 de julho de 2013;122(3):376–85.
67. Safe S, Lee S-O, Jin U-H. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Carcinogenesis and Potential as a Drug Target. *Toxicological Sciences*. setembro de 2013;135(1):1–16.
68. Li Z-D, Wang K, Yang X-W, Zhuang Z-G, Wang J-J, Tong X-W. Expression of aryl hydrocarbon receptor in relation to p53 status and clinicopathological parameters in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(11):7931–7.
69. Tomkiewicz C, Herry L, Bui L-C, Métayer C, Bourdeloux M, Barouki R, et al. The aryl hydrocarbon receptor regulates focal adhesion sites through a non-genomic FAK/Src pathway. *Oncogene*. abril de 2013;32(14):1811–20.
70. Chang L-C, Huang C-H, Cheng C-H, Chen B-H, Chen H-C. Differential Effect of the Focal Adhesion Kinase Y397F Mutant on v-Src-Stimulated Cell Invasion and Tumor Growth. *J Biomed Sci*. julho de 2005;12(4):571–85.
71. Badawy AA-B. Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy. *Bioscience Reports*. 1º de outubro de 2015;35(5):e00261.
72. Sadok I, Gamian A, Staniszewska MM. Chromatographic analysis of

tryptophan metabolites. *J Sep Sci.* agosto de 2017;40(15):3020–45.

73. Fernstrom JD. A Perspective on the Safety of Supplemental Tryptophan Based on Its Metabolic Fates. *The Journal of Nutrition.* 1º de dezembro de 2016;146(12):2601S-2608S.
74. Boadle-Biber MC. Regulation of serotonin synthesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* janeiro de 1993;60(1):1–15.
75. Kema IP, de Vries EGE, Muskiet FAJ. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* setembro de 2000;747(1–2):33–48.
76. Silva, Maysa Braga Barros. Efeitos da luz sobre o metabolismo de triptofano em melanócitos e melanomas [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2017 [citado 2019-11-28]. doi:10.11606/D.9.2017.tde-25042017-171354
77. Araújo AM, Carvalho F, Bastos M de L, Guedes de Pinho P, Carvalho M. The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Arch Toxicol.* agosto de 2015;89(8):1151–73.
78. Hamill J, Hallak J, Dursun SM, Baker G. Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness. *CN.* 7 de janeiro de 2019;17(2):108–28.
79. Rodrigues AV, Almeida FJ, Vieira-Coelho MA. Dimethyltryptamine: Endogenous Role and Therapeutic Potential. *Journal of Psychoactive Drugs.* 8 de agosto de 2019;51(4):299–310.
80. Inserra A. Hypothesis: The Psychedelic Ayahuasca Heals Traumatic Memories via a Sigma 1 Receptor-Mediated Epigenetic-Mnemonic Process. *Front Pharmacol.* 5 de abril de 2018;9:330.
81. Barker SA. N, N-Dimethyltryptamine (DMT), an Endogenous Hallucinogen: Past, Present, and Future Research to Determine Its Role and Function. *Front Neurosci.* 6 de agosto de 2018;12:536.
82. Cameron LP, Olson DE. Dark Classics in Chemical Neuroscience: N, N - Dimethyltryptamine (DMT). *ACS Chem Neurosci.* 17 de outubro de 2018;9(10):2344–57.
83. Gomes MM, Coimbra JB, Clara RO, Dörr FA, Moreno ACR, Chagas JR, et al. Biosynthesis of N,N-dimethyltryptamine (DMT) in a melanoma cell line and its metabolization by peroxidases. *Biochemical Pharmacology.* abril de 2014;88(3):393–401.
84. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods.* dezembro de 2001;25(4):402–8.

85. Platten M, Nollen EAA, Röhrig UF, Fallarino F, Opitz CA. Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* maio de 2019;18(5):379–401.
86. Adams S, Braidy N, Bessesde A, Brew BJ, Grant R, Teo C, et al. The Kynurenine Pathway in Brain Tumor Pathogenesis. *Cancer Research.* 15 de novembro de 2012;72(22):5649–57.
87. Platten M, Wick W, Van den Eynde BJ. Tryptophan Catabolism in Cancer: Beyond IDO and Tryptophan Depletion. *Cancer Research.* 1º de novembro de 2012;72(21):5435–40.
88. Bizzarri M, Proietti S, Cucina A, Reiter RJ. Molecular mechanisms of the pro-apoptotic actions of melatonin in cancer: a review. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* dezembro de 2013;17(12):1483–96.
89. Kim HS, Kim T-J, Yoo Y-M. Melatonin Combined with Endoplasmic Reticulum Stress Induces Cell Death via the PI3K/Akt/mTOR Pathway in B16F10 Melanoma Cells. Mohanraj R, organizador. *PLoS ONE.* 19 de março de 2014;9(3):e92627.
90. Kema IP, de Vries EGE, Muskiet FAJ. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* setembro de 2000;747(1–2):33–48.
91. Szeitz A, Bandiera SM. Analysis and measurement of serotonin. *Biomedical Chromatography.* janeiro de 2018;32(1):e4135.
92. Salikov RF, Trainov KP, Belousova IK, Belyy AYU, Fatkullina USH, Mulyukova RV, et al. Branching tryptamines as a tool to tune their antiproliferative activity. *European Journal of Medicinal Chemistry.* janeiro de 2018;144:211–7.
93. Salikov RF, Belyy AYU, Khusnutdinova NS, Vakhitova YV, Tomilov YV. Synthesis and cytotoxic properties of tryptamine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* setembro de 2015;25(17):3597–600.
94. Reyes F, Martín R, Fernández R. Granulatamides A and B, Cytotoxic Tryptamine Derivatives from the Soft Coral *Eunicella granulata*. *J Nat Prod.* abril de 2006;69(4):668–70.
95. Adla SK, Sasse F, Kelter G, Fiebig H-H, Lindel T. Doubly prenylated tryptamines: cytotoxicity, antimicrobial activity and cyclisation to the marine natural product flustramine A. *Org Biomol Chem.* 2013;11(36):6119.
96. Coimbra JB. Ação de metabólitos da via das triptaminas em linhagens de melanomas [Internet] [Doutorado em Análises Clínicas]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2015 [citado 3 de março de 2020]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-26102015-093528/>
97. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using

Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. dezembro de 2001;25(4):402–8.

98. SANGER, F.; Coulson, A. R.. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, v. 94, n. 3, p. 441-448,1975.
99. SAMBROOK, J. et al. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
100. Cameron LP, Benson CJ, Dunlap LE, Olson DE. Effects of N , N - Dimethyltryptamine on Rat Behaviors Relevant to Anxiety and Depression. *ACS Chem Neurosci*. 18 de julho de 2018;9(7):1582–90.
101. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Science Signaling*. 2 de abril de 2013;6(269):p11–p11.
102. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data: Figure 1. *Cancer Discovery*. maio de 2012;2(5):401–4.
103. Clark AG, Vignjevic DM. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Current Opinion in Cell Biology*. outubro de 2015;36:13–22.
104. Fernandez-Salguero PM. A remarkable new target gene for the dioxin receptor: The Vav3 proto-oncogene links AhR to adhesion and migration. *Cell Adhesion & Migration*. abril de 2010;4(2):172–5.
105. Carvajal-Gonzalez JM, Mulero-Navarro S, Roman AC, Sauzeau V, Merino JM, Bustelo XR, et al. The Dioxin Receptor Regulates the Constitutive Expression of the Vav3 Proto-Oncogene and Modulates Cell Shape and Adhesion. Adams JC, organizador. *MBoC*. 15 de março de 2009;20(6):1715–27.
106. Cox BD, Natarajan M, Stettner MR, Gladson CL. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J Cell Biochem*. 1º de setembro de 2006;99(1):35–52.
107. Brabek J. Crk-Associated Substrate Tyrosine Phosphorylation Sites Are Critical for Invasion and Metastasis of Src-Transformed Cells. *Molecular Cancer Research*. 1º de junho de 2005;3(6):307–15.
108. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Current Opinion in Cell Biology*. outubro de 2006;18(5):516–23.
109. Occhi G, Barollo S, Regazzo D, Bertazza L, Galuppini F, Guzzardo V, et al. A constitutive active MAPK/ERK pathway due to BRAF^{V600E} positively regulates AHR pathway in PTC. *Oncotarget* [Internet]. 13 de outubro de 2015 [citado 4

de março de 2020];6(31). Disponível em:
<http://www.oncotarget.com/fulltext/5194>

110. Henklová P, Vrzal R, Ulrichová J, Dvořák Z. Role of mitogen-activated protein kinases in aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chemico-Biological Interactions*. março de 2008;172(2):93–104.
111. Puga A, Ma C, Marlowe JL. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology*. fevereiro de 2009;77(4):713–22.
112. Lander ES. The Heroes of CRISPR. *Cell*. janeiro de 2016;164(1–2):18–28.
113. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim J-S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*. março de 2013;31(3):230–2.
114. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. novembro de 2013;8(11):2281–308.
115. Yin J, Sheng B, Qiu Y, Yang K, Xiao W, Yang H. Role of AhR in positive regulation of cell proliferation and survival. *Cell Prolif*. outubro de 2016;49(5):554–60.
116. Pyzocha NK, Ran FA, Hsu PD, Zhang F. RNA-Guided Genome Editing of Mammalian Cells. In: Storici F, organizador. *Gene Correction* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2014 [citado 6 de março de 2020]. p. 269–77. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-761-7_17
117. Aluru N, Karchner SI, Franks DG, Nacci D, Champlin D, Hahn ME. Targeted mutagenesis of aryl hydrocarbon receptor 2a and 2b genes in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic Toxicology*. janeiro de 2015;158:192–201.
118. Waaijers S, Portegijs V, Kerver J, Lemmens BBLG, Tijsterman M, van den Heuvel S, et al. CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. novembro de 2013;195(3):1187–91.
119. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*. 8 de janeiro de 2019;47(D1):D607–13.
120. Kuhn M, von Mering C, Campillos M, Jensen LJ, Bork P. STITCH: interaction networks of chemicals and proteins. *Nucleic Acids Research*. 23 de dezembro de 2007;36(Database):D684–8.
121. Collina S, Bignardi E, Rui M, Rossi D, Gaggeri R, Zamagni A, et al. Are sigma modulators an effective opportunity for cancer treatment? A patent overview (1996-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 4 de maio de

2017;27(5):565–78.

122. Collina S, Gaggeri R, Marra A, Bassi A, Negrinotti S, Negri F, et al. Sigma receptor modulators: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. maio de 2013;23(5):597–613.
123. Markos-Orestis Georgiadis, Olga Karoutzou, Angeliki-Sofia Foscolos, Ioannis Papanastasiou. Sigma Receptor (σ R) Ligands with Antiproliferative and Anticancer Activity. *Molecules*. 25 de agosto de 2017;22(9):1408.
124. Longhitano L, Castracani CC, Tibullo D, Avola R, Viola M, Russo G, et al. Sigma-1 and Sigma-2 receptor ligands induce apoptosis and autophagy but have opposite effect on cell proliferation in uveal melanoma. *Oncotarget* [Internet]. 31 de outubro de 2017 [citado 8 de março de 2020];8(53). Disponível em: <http://www.oncotarget.com/fulltext/19556>
125. Van Waarde A, Rybczynska A, K. Ramakrishnan N, Ishiwata K, H. Elsinga P, A.J.O. Dierckx R. Sigma Receptors in Oncology: Therapeutic and Diagnostic Applications of Sigma Ligands. *CPD*. 1º de outubro de 2010;16(31):3519–37.1.
126. Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB, Ruoho AE. The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. *Science*. 13 de fevereiro de 2009;323(5916):934–7.
127. Carbonaro TM, Gatch MB. Neuropharmacology of N,N-dimethyltryptamine. *Brain Research Bulletin*. setembro de 2016;126:74–88.
128. Su T-P, Hayashi T, Vaupel DB. When the Endogenous Hallucinogenic Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine Meets the Sigma-1 Receptor. *Science Signaling*. 10 de março de 2009;2(61):pe12–pe12.
129. Frecska E, Szabo A, Winkelman MJ, Luna LE, McKenna DJ. A possibly sigma-1 receptor mediated role of dimethyltryptamine in tissue protection, regeneration, and immunity. *J Neural Transm*. setembro de 2013;120(9):1295–303. 1.
130. Delatore LG, Simões RAL, Gazola RM, Albuquerque RCAPD, Fernandes D de CT. Discinesia paroxística não cinesiogênica. *RMRP*. 5 de julho de 2019;52(2):150–5.
131. Camargo CHF, Camargos ST, Cardoso FEC, Teive HAG. The genetics of the dystonias – a review based on the new classification of the dystonias. *Arq Neuro-Psiquiatr*. abril de 2015;73(4):350–8.
132. Bragg DC, Armata IA, Nery FC, Breakefield XO, Sharma N. Molecular pathways in dystonia. *Neurobiology of Disease*. maio de 2011;42(2):136–47. 1.
133. Sambo DO, Lebowitz JJ, Khoshbouei H. The sigma-1 receptor as a regulator

of dopamine neurotransmission: A potential therapeutic target for methamphetamine addiction. *Pharmacology & Therapeutics*. junho de 2018;186:152–67.

- 134.** Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. *Nat Methods*. 2014 Aug;11(8):783-4. doi: 10.1038/nmeth.3047. 10.1038/nmeth.3047 PubMed 25075903
- 135.** Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272(5259):263–267. doi:10.1126/science.272.5259.263 (<http://web.mit.edu/jacks-lab/protocols/lentiviruses.html>)
- 136.** pPIC9K A Pichia Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression Catálogo no. V175–20. Manual do usuário. Version G 03 June 2010 25-0106.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Histórico escolar do aluno (Ficha do aluno)

3/16/2020

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 7941927/1 - Maria Carmen Oliveira Pinho de Sales

Email: mcarmensales@usp.br
Data de Nascimento: 12/05/1985
Cédula de Identidade: RG - 13.212.516 - MG
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Ciências - Universidade Federal de Juiz de Fora - Minas Gerais - Brasil - 2010
Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Doenças Tropicais e Saúde Internacional - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2014

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 07/12/2015
Início da Contagem de Prazo: 07/12/2015
Data Limite para o Depósito: 06/04/2020
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ana Campa - 09/01/2017 até o presente. Email: anacampa@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria Engler - 10/10/2017 até o presente. Email: silvy@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/11/2015
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 07/12/2019 até 05/04/2020

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 14/12/2017

Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 07/12/2015
Prorrogação em 14/10/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/01/2020

Impresso em: 16/03/2020 11:36:10

3/16/2020

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 7941927/1 - Maria Carmen Oliveira Pinho de Sales

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5753-3/2	Processos de Invasão Celular	01/03/2016	11/04/2016	90	6	100	B	N	Concluída
FBC5792-3/3	Tópicos em Análises Clínicas III	08/03/2016	20/06/2016	15	1	87	A	N	Concluída
QBQ5888-2/2	Tópicos em Metabolismo (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	26/04/2016	20/06/2016	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5766-4/3	Tópicos em Análises Clínicas IV	02/08/2016	14/11/2016	15	1	100	A	N	Concluída
QBQ5715-11/1	Planejamento de Aulas Práticas de Bioquímica e Biologia Molecular (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	17/08/2016	08/11/2016	120	8	100	A	N	Concluída
Crédito Externo	Metabolismo Tumoral (1)	31/03/2017	07/07/2017	-	6	94	T	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	30
Estágios:			
Total:	0	20	30

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

T) Disciplinas(s) cursada(s) na(o) Universidade Federal de São Paulo. Atribuição de créditos aprovada pelo(a) Comitê de Pós-Graduação em Sessão de 13/09/2017.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(T) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 15/01/2020

Impresso em: 16/03/2020 11:36:10

8.2 Anexo 2 - Currículo Lattes do aluno



Maria Cármen Oliveira Pinho de Sales

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5396809101144281>

ID Lattes: 5396809101144281

Última atualização do currículo em 08/11/2019

Doutorado em andamento pela Universidade de São Paulo - USP, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, nas grandes áreas de fisiopatologia, bioquímica e biologia molecular e genética (2015). Pesquisa e Desenvolvimento (Mestrado em Ciências - Medicina Tropical e Saúde Internacional concluído) pela Universidade de São Paulo - USP nas grandes áreas de Parasitologia, Biologia Molecular, Regulação gênica (2014) com ênfase na regulação da expressão gênica em modelo de células eucarióticas. Possui graduação nas modalidades de Licenciatura (2010) e Bacharelado (2011) em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Maria Cármen Oliveira Pinho de Sales
Nome em citações bibliográficas	SALES, M. C. O. P.; SALES, MARIA CARMEN OLIVEIRA DE PINHO; Sales MCO-P
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/5396809101144281

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Cidade Universitária Butantã 05508900 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30913741
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2015	Doutorado em andamento em Doutorado, Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: O receptor aril de hidrocarbonetos (AHR) em melanomas: associação com mutações BRAF, com a progressão da doença e identificação de ligantes. Orientador: Ana Campa. Coorientador: Silvy Stuchi Maria-Engler. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Palavras-chave: receptor aril hidrocarbonetos; triptofano; melanoma. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Morfologia / Subárea: Bioquímica. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Morfologia / Subárea: Biologia Molecular.
2012 - 2014	Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Internacional, Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Regulação da expressão do transportador de aminoácidos de Leishmania (L.) amazonensis. Ano de Obtenção: 2014. Orientador: Lucile Maria Floeter-Winter. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Leishmania; proteínas de transporte; arginina; efeitos da temperatura. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Protozoologia de Parasitos / Especialidade: Protozoologia Parasitária Humana. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular. Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.
2006 - 2011	Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado, Universidade Federal de Juiz de Fora, UFZF, Brasil.
2006 - 2010	Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, UFZF, Brasil.

Formação Complementar

2011 - 2011	Extensão universitária em VII Curso Inverno-Tópicos Psicologia Comparativa. (Carga horária: 120h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2011 - 2011	Extensão universitária em Métodos Moleculares Aplicados a Parasitologia. (Carga horária: 40h). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.
2009 - 2009	Rádio - Telemetria. (Carga horária: 5h). IX Congresso de Ecologia do Brasil, ECOL, Brasil.
2008 - 2008	O conhecimento científico e o educador. (Carga horária: 12h). Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil.
2007 - 2007	Extensão universitária em Tópicos Especiais em Paleontologia. (Carga horária: 40h). Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil.
2007 - 2007	Genética da Conservação. (Carga horária: 12h). Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil.
2006 - 2006	Organismos indicadoras da qualidade de água. (Carga horária: 15h). Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil.
2006 - 2006	Espaços territoriais especialmente protegidos. (Carga horária: 12h). Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil.

Atuação Profissional

Faculdades de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil.

Vínculo institucional

2019 - 2019

Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6
Disciplina de graduação: Fisiopatologia II. Atividades desenvolvidas: participação em organização e montagem de exemplares para aulas práticas, auxílio no desenvolvimento de aulas teóricas e práticas, aplicação de provas e testes, correção de provas práticas e pequenos testes, criação de casos clínicos.

Vínculo institucional

2017 - 2017

Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitor, Carga horária: 6
Disciplina de graduação: Fisiopatologia II. Atividades desenvolvidas: participação em organização e montagem de exemplares para aulas práticas, auxílio no desenvolvimento de aulas teóricas e práticas, aplicação de provas e testes, correção de provas práticas e pequenos testes, criação de casos clínicos.

Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2011

Atividades

09/2010 - 05/2011

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estagiário

Estágios, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia e Microbiologia.
Estágio realizado

○ AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA DE NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DA CLOROQUINA EM *Plasmodium berghei*.

04/2010 - 12/2010

Estágios, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia e Microbiologia.
Estágio realizado

Monitor na Disciplina Diagnóstico Laboratorial Parasitológico.

09/2009 - 12/2009

Estágios, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia.

Estágio realizado

05/2008 - 02/2009

Monitor na disciplina Protozoários I.

Treinamentos ministrados, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia.

Treinamentos ministrados

Treinamento Profissional: Diagnóstico, Monitoramento e Controle de Zoonoses: uma

área de atuação do Biólogo

04/2008 - 11/2008

Estágios, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia.

Estágio realizado

Monitor na disciplina Protozoários I.

07/2008 - 07/2008

Estágios, ○ ARCELOR MITTAL INOX BRASIL - Empresa privada, .

Estágio realizado

PROJETO OIKÓS ? Atividades: Educação Ambiental-Biogestor -Centro de Mudanças Ambientais e Relatório de Impacto Ambiental-Desenvolvimento Projeto Contra- Incêndio.

01/2007 - 03/2008

Estágios, Instituto de Ciências Biológicas, .

Estágio realizado

○ PARTICIPAÇÃO EM GESTÃO ADMINISTRATIVA - Departamento de Marketing - Biociclos (Empresa Jr. De Consultoria e Projetos em Biologia e Meio Ambiente).

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Biologia Molecular.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Biologia Geral.
3. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Protozoologia Parasitária Humana.
4. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética.
5. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Bioquímica.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1. AOKI, JULIANA IDE ; MUXEL, SANDRA MARCIA ; ZAMPIERI, RICARDO ANDRADE ; ACUÑA, STEPHANIE MAJA ; FERNANDES, JULIANE CRISTINA RIBEIRO ; VANDERLINDE, RUBIA HELOISA ; **SALES, MARIA CARMEN OLIVEIRA DE PINHO** ; FLOETER-WINTER, LUCILE MARIA . L-arginine availability and arginase activity: Characterization of amino acid permease 3 in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **11**, v. 11, p. e0006025, 2017.

Apresentações de Trabalho

1. **SALES, M. C. O. P.**; ZAMPIERI, R. A.; MUXEL, S. M.; SILVA, M. F. L.; FLOETER-WINTER, L. M. . Temperature and pH are important signaling in regulating *Leishmania (L.) amazonensis* amino acid transporter AAP3 expression.. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. **SALES, M. C. O. P.**; MUXEL, S. M.; SILVA, M. F. L.; FLOETER-WINTER, L. M.; **SALES, M. C. O. P.** . Signal mediators of arginine transporter expression in *Leishmania (L.) amazonensis*. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Fifth World Congress on Leishmaniasis - Worldleish5. 2013. (Congresso).
2. XXXIII Semana de Biologia Diagnóstico da Ictiofauna da bacia do Ribeirão Marmelo, Juiz de Fora, MG.. 2010. (Simpósio).
3. IX Congresso de Ecologia do Brasil III Congresso Latino Americano de Ecologia. 2009. (Congresso).
4. XXXI Semana de Biologia. 2008. (Simpósio).
5. XXX Semana de Biologia. 2007. (Simpósio).
6. XXXIX Semana de Biologia. 2006. (Simpósio).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **Sales MCOP**. 7 VIII Simpósio De Pós-Graduação Em Análises Clínicas 7 Simpact And III International Symposium On Pathophysiology And Toxicology - Ispat. 2018. (Congresso).
2. **Sales MCOP**. Curso de Extensão Instituto de Química. 2016. (Outro).
3. **Sales MCOP**. Curso de Extensão 7Tópicos Especiais Em Paleontologia?. 2007. (Outro).

Educação e Popularização de C & T

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **Sales MCOP**. 7 VIII Simpósio De Pós-Graduação Em Análises Clínicas 7 Simpact And III International Symposium On Pathophysiology And Toxicology - Ispat. 2018. (Congresso).
2. **Sales MCOP**. Curso de Extensão 7Tópicos Especiais Em Paleontologia?. 2007. (Outro).
3. **Sales MCOP**. Curso de Extensão Instituto de Química. 2016. (Outro).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 16/03/2020 às 11:35:00

[Imprimir currículo](#)

8.3 Anexo 3 – Comissão Interna de Biossegurança (CIBio)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança



Of.CIBio/0342017/FCF

São Paulo, 10 de novembro de 2017

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que em reunião da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas realizada no dia 08 de novembro p.p., o Projeto *O receptor aril de hidrocarbonetos (AHR) em melanomas: associação com mutações BRAF, com a progressão da doença e identificação de ligantes* foi aprovado.

Atenciosamente,


Prof. Dr. JOÃO CARLOS MONTEIRO DE CARVALHO
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. SILVIA STUCCHI MARIA ENGLER

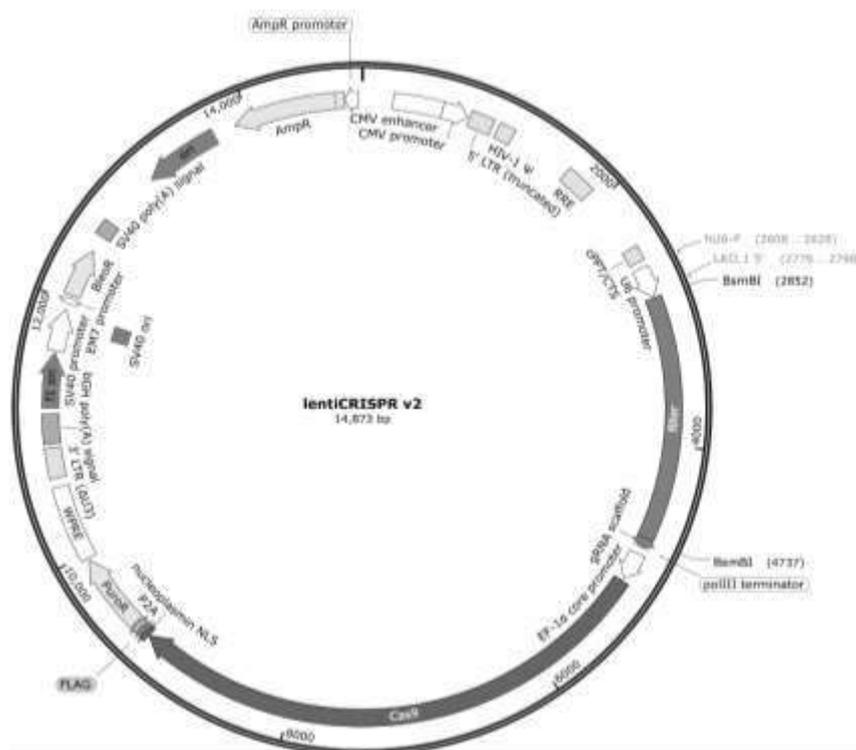
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

8.4 Mapas dos vetores usados no projeto

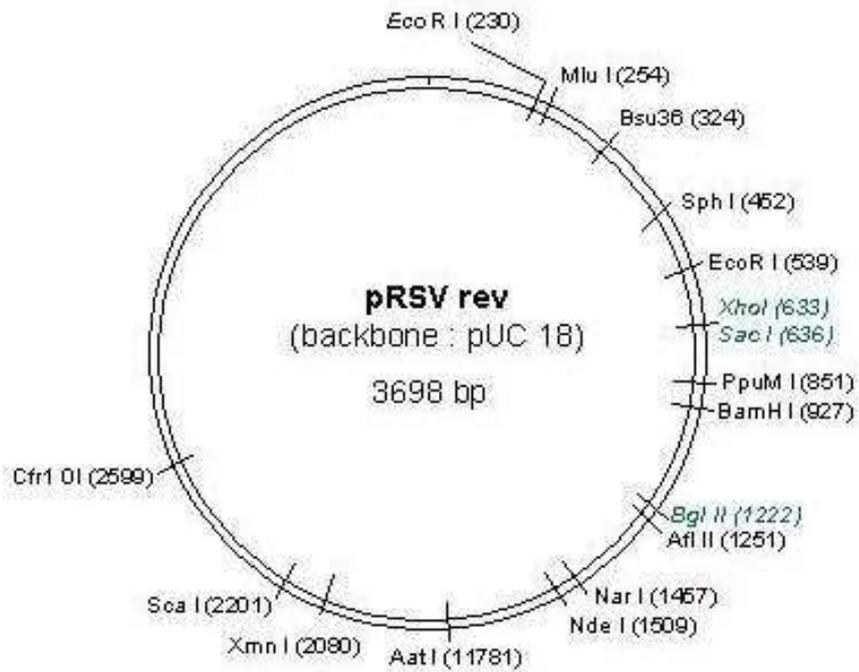
8.4.1 Vetor plentCRISPRv2 (Addgene)

Vetor de expressão lentiviral para Cas9 de *Streptococcus pyogenes* e RNA guia no sistema lentCRISPRv2. As partes de destaque são: sinal de empacotamento *psi* (*psi* +), elemento de resposta rev (RRE), trato polipurino central (cPPT), promotor curto do fator de alongamento-1 α (EFS), tag de octapeptídeo FLAG (FLAG), peptídeo de auto-clivagem 2A (P2A), marcador de seleção de puromicina (*puro*), elemento regulador pós-transcricional (WPRE), marcador de seleção de blasticidina (*blast*) e promotor do fator de alongamento-1 α (EF1 α)⁽¹³⁴⁾.



8.4.2 Vetor *helper* p59

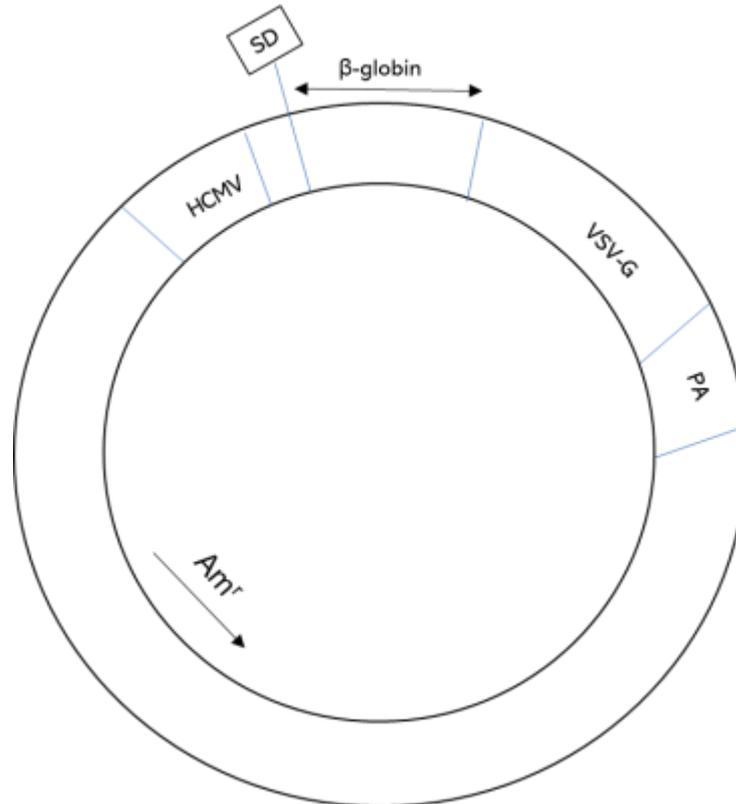
O desenho mostra apenas sítios de reconhecimento das enzimas de digestão. O RSV-Rev expressa o cDNA rev⁽¹³⁵⁾.



Map courtesy of Trono Lab:
<http://www.tronolab.unige.ch/index.htm>

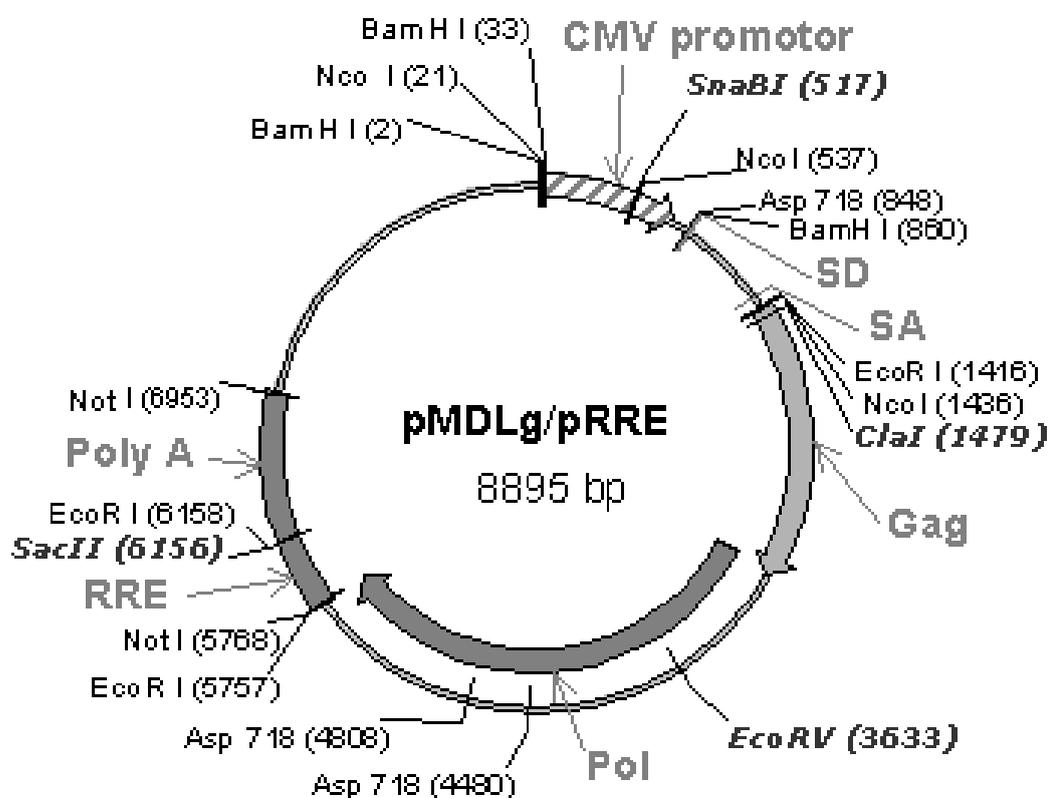
8.4.3 Vetor *helper* p60

O vetor p60 expressa o envelope, codificado por VSV-G (135). HCMV imediato do citomegalovírus humano; VSV-G, o cDNA que codifica a proteína VSV-G; PA, sinal de poliadenilação do gene b-globina de coelhos; e Amr, gene de resistência a ampicilina do vetor pBR322.



8.4.4 Vetor *helper* p61

O vetor contém o principal sítio doador de splicing SD, a sequência RRE, expressa ainda o gene gag e pol através do promotor CMV, e intervendo sequências e o sítio de poliadenilação do gene da humano β -globina. Como os transcritos de gag e pol contém sequências cis-repressivas, eles são expressos somente se Rev promover sua exportação pela ligação a RRE (136).



8.4.5 Vetor pPIC9K (Invitrogen)

Comentários dos 9276 pares de bases do vetor: fragmento do promotor 5'AOX1: 1-949pb; sítio primário 5'AOX1: 855-875pb; sinal (is) de secreção fator α : 949-1218pb; sítio primário de fator α : 1152-1172; múltiplo sítio de clonagem: 1192-1241pb; sítio primário 3'AOX1: 1327-1347pb; terminação de transcrição (TT) 3'AOX1: 1253-1586; ORF HIS4:4514-1980pb; gene de resistência a canamicina: 5743-4928pb; fragmento 3'AOX1:6122-6879pb; origem pBR322: 7961-7288pb; gene de resistência a ampicilina: 8966-8106pb ⁽¹³⁵⁾.

