

CELESTINO PRÓSPERO DE SOUZA SOBRINHO

**AÇÃO DO AZT NA EXPRESSÃO GÊNICA E NA SÍNTESE
PROTEÍCA DA TELOMERASE NAS CÉLULAS DE
MELANOMA METASTÁTICO HUMANO**

**Tese apresentada à Universidade Federal São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Ciências.**

São Paulo

2017

CELESTINO PRÓSPERO DE SOUZA SOBRINHO

**AÇÃO DO AZT NA EXPRESSÃO GÊNICA E NA SÍNTESE
PROTEÍCA DA TELOMERASE NAS CÉLULAS DE
MELANOMA METASTÁTICO HUMANO**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. IVAN DUNSHEE A. O. SANTOS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA TRANSACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

Dedicatória

“Dedico este trabalho a minha família, minha esposa Joana Darc, minha filha Yasmin Vidal, minha mãe Inez Maia, meu tio Sidnei Fortunato (in memoriam) pessoas que sempre, com muito apoio, ombro e compreensão, nunca deixaram com que eu perdesse meu caminho”.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**, titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e Coordenadora do Laboratório de Cultura de Células, pelo apoio, orientações, suporte e estrutura nesta jornada.

Ao **Prof. Dr. IVAN DUNSHEE DE ABRANCHES OLIVEIRA SANTOS**, associado livre docente aposentado da Disciplina de Cirurgia Plástica da EPM. UNIFESP, Pelas orientações, apoio e por agradecer-me com mais essa oportunidade de ser meu coorientador, voz da razão e sabedoria que sempre pude contar, um porto seguro em momentos difíceis.

Ao **Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**, adjunto Livre-Docente e Coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp, por ir muito além de um coorientação, por todos os conselhos valiosos, por ser ponderado, sábio, entender minhas dificuldades, que foram muitas, por não desistir desse aluno, pelo apoio incondicional, de todas as maneiras possíveis a esse trabalho.

A **Profa. SILVANA GAIBA**, pesquisadora da Universidade Estadual de Santa Cruz e Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP, agradeço pela orientação, inestimável apoio, valorosa amizade, parceria e paciência com minhas deficiências, que foram muitas.

A **Profa. ANDRÉA FERNANDES DE OLIVEIRA**, Doutora em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em cirurgia translacional agradeço pela parceria, colaboração e grande apoio, por estar sempre disponível, em todos os momentos que precisei de seus conhecimentos, além de sua grande amizade.

Ao **Prof. JERÔNIMO PEREIRA DE FRANCA**, Doutor adjunto do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz, pelo conhecimento transmitido e esclarecimentos sobre comportamento metabólico celular e técnicas laboratoriais que foram de ajuda inestimável.

Ao **Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE**, Pós- doutorado pelo programa de pós-graduação em cirurgia translacional da UNIFESP, agradeço pela parceria, grande ajuda e colaboração e valiosos conselhos durante a elaboração deste trabalho.

A **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE DOS REIS SILVA, e SILVANA APARECIDA DE ASSIS**, secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP pela atenção, ajuda e suporte em todas as minhas deficiências.

*“Quanto mais conhecimentos adquirimos, mais a nossa
ignorância se revela”*

John F. Kennedy, Houston, Texas, 1962.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XI
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO.....	7
LITERATURA.....	9
MÉTODOS.....	29
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	67
NORMAS ADOTADAS.....	77
ABSTRACT.....	79
APÊNDICES.....	81
ANEXOS.....	87
FONTES CONSULTADAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PUNÇÃO ASPIRATIVA POR AGULHA FINA	33
FIGURA 2. DESCRIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
FIGURA 3. MIGRAÇÃO CELULAR DO FRAGMENTO.....	36
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO DO CITÔMETRO DE FLUXO	41
FIGURA 5. ESQUEMA DO KIT DE DETECÇÃO DA TELOMERASE	44
FIGURA 6. CURVA DE CONCENTRAÇÃO RESPOSTA DO AZT 1 A 8 HORAS.....	47
FIGURA 7. CURVA DE CONCENTRAÇÃO RESPOSTA DO AZT 24, 48, 72 HORAS.....	48
FIGURA 8. APOPTOSE TEMPO 5HORAS	49
FIGURA 9. APOPTOSE TEMPO 24HORAS	50
FIGURA 10. P53 TEMPO 5 HORAS	51
FIGURA 11. P53. TEMPO 24 HORAS	52
FIGURA 12. TELOMERASE TEMPO 5 HORAS	53
FIGURA 13. TELOMERASE TEMPO 24 HORAS	54
FIGURA 14. RT-PCR TELOMERASE	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção americana de modelos de culturas)
AZT	Azidotimidina-trifosfato, Zidovudina
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
<i>et al.</i>	e outros
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i> (Transcriptase reversa da telomerase em humanos)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
µg	microgramas
mg	miligramas
µl	microlitros
µM	micromolar
mRNA	RNA mensageiro
ml	mililitros
MTT	Microtitulação colorimétrica
primer TS	Iniciador sintético de sequência nucleotídica
P53	gene supressor tumoral, transcreve proteína p53
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Solução salina tamponada)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da Polimerase)
SFB	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Soro fetal bovino)
TRAP	<i>Telomerase Repeated Amplification Protocol</i> (Protocolo de Amplificação e Repetição Telomérica)

RESUMO

Introdução: O melanoma é uma neoplasia cutânea melanocítica que possui caráter agressivo e rápida expansão. Vários fatores contribuem para o seu surgimento, como a predisposição genética, exposição solar, traumatismos físicos em nevos já existentes e imunodeficiências. Tanto em melanoma como em outras neoplasias, evidências demonstram que o processo de transformação maligna envolve várias alterações genéticas, que modificam processos celulares importantes, incluindo proliferação, diferenciação e morte programada da célula, processos estes também associados ao encurtamento dos telômeros. A enzima responsável pela síntese do telômero é conhecida como telomerase, uma transcriptase reversa especializada que pode ser associada com imortalização celular e câncer, sua atividade está ausente na maioria das células somáticas humanas normais e presentes em quase todas as linhagens de células tronco, imortais, germinativas e em aproximadamente 90% dos tumores humanos. A capacidade finita de replicações celulares é ultrapassada por células imortalizadas, que reativam a telomerase, sugerindo que a progressão de doenças malignas depende de sua reativação, e que um agente inibidor dessa enzima como a zidovudina (AZT) poderia ser uma droga antitumoral efetiva. **Objetivo:** Avaliar a ação do AZT na expressão gênica e na síntese proteica da telomerase nas células de melanomas metastático. **Métodos:** Foram utilizadas células de pacientes provenientes de amostras de tecidos da região torácica, plantar, linfonodos axilares, linfonodos inguinais doadas em centro cirúrgico do hospital São Paulo e linhagens de células de melanoma Hs839T. As células foram cultivadas em meio de cultura suplementadas com 1000 μ M de AZT em triplicata por 5h e 24h e comparados seus efeitos ao grupo controle. A avaliação da proliferação celular foi realizada pela técnica do microtitulação colorimétrica (MTT). A caracterização das células, marcação para P53, apoptose, detecção da telomerase (expressão proteica) foi realizada por citometria de fluxo e amplificação gênica da telomerase por PCR RT. **Resultados:** A ação do AZT diminuiu a expressão gênica da telomerase nas células estudadas com diferença estatisticamente significativa, não diminuindo a síntese proteica da enzima. **Conclusão:** O AZT induziu a diminuição da expressão gênica da telomerase sem promover alteração na síntese dessa enzima em células de melanoma metastático humano.

Souza Sobrinho, Celestino Próspero
Ação do AZT na expressão gênica e na síntese proteica da telomerase nas células de melanoma metastático humano./
Celestino Próspero de Souza Sobrinho. --São Paulo, 2017.
x, 89f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.
Título em inglês: Action of AZT on gene expression and protein synthesis on telomerase in human metastatic melanoma cells.

1. Telomerase. 2. Melanoma. 3. p53. 4. Neoplasias Cutâneas. 5. Azidotimidina. 5. Células. 6. *In Vitro*.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia cutânea melanocítica que possui caráter expansivo, um tipo de câncer derivado de células que fornecem a pigmentação a outras células, através da secreção de melanina de célula para célula. Surge a partir da transformação maligna dos melanócitos, sendo a forma mais letal de câncer de pele. Apesar de o diagnóstico ser cada vez mais precoce, a mortalidade e a incidência da doença ainda atingem níveis muito elevados (SANTOS *et al.*, 1996, CHUDNOVSKY, *et al.* 2005, FERREIRA *et al.*,2006, FLACH *et al.*; 2011, VAZQUEZ *et al.*,2015; PARREIRAS *et al.*; 2016).

Ocupa o terceiro lugar em incidência dentre as neoplasias malignas de pele, com acentuado índice de aumento nas últimas décadas (FOX *et al.*; 2013).

Vários fatores contribuem para o seu surgimento, como a predisposição genética, exposição solar, traumatismos físicos em nevos já existentes e imunodeficiências (OLIVEIRA FILHO *et al.*,2002; FIGUEIREDO *et al.*, 2003; NAM *et al.*, 2016; GANDINI *et al.*, 2016).

A maioria dos melanócitos se encontra na pele, constituindo sua maior incidência cutânea, o melanoma cutâneo, podendo, porém, ocorrer nos olhos, meninge, trato digestivo, linfonodos e em outras áreas. Pacientes quando diagnosticados na fase inicial, apresentam probabilidade de cura elevada (SOBER & KHO, 1995; NIEZGODA *et al.*, 2015).

São diagnosticados aproximadamente 200 mil pacientes com melanoma cutâneo por ano em todo o mundo (GANDINI *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos da América, em menos de meio século, houve um crescimento de 600%, com uma incidência para o final de 2015 de 73870 novos casos, resultando em 9940 mortes (HAN *et al.*, 2016).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) em 2016, o melanoma representou 4% das neoplasias malignas da pele, apesar de ser o mais grave devido à alta possibilidade de metástase, com estimativas de 5670 novos casos para o final de 2016. De acordo com Ministério da Saúde a expectativa dos gastos totais com assistência oncológica no Brasil, neste ano, ficou em torno de R\$ 3,4 bilhões, destes, somente com melanoma cutâneo em internação ambulatorial e hospitalar, somaram-se R\$ 7,3 milhões (INCA 2016; Secretaria de Atenção a Saúde 2016).

Estudos *in vitro* utilizando o melanoma foram descritos pela primeira vez em 1914, porém, o sucesso da cultura desta neoplasia ocorreu somente em 1966 por Brown e colaboradores, demonstrando a dificuldade em cultura deste tipo de célula e a necessidade de se buscar novas técnicas que facilitem sua proliferação (GERNER *et al.*, 1975).

Tanto em melanoma como em outras neoplasias, há evidências de que o processo de transformação maligna envolve várias alterações genéticas, que interferem em processos celulares importantes incluindo proliferação, diferenciação e

apoptose celular. (VOZZA *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2006; BAREN *et al.*, 2013).

Em particular, a maquinaria de ciclo de divisão celular parece alterada em células malignas, especialmente em tumores de pele que são frequentemente associados a danos no DNA decorrentes entre outros fatores, dos raios UV, tendo como consequência direta a manutenção do tamanho dos telômeros (VOZZA *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2006).

Telômeros são estruturas especializadas descritas pela primeira vez em 1930, existentes na porção terminal dos cromossomos das células eucarióticas, são áreas de heterocromatina constitutiva compostas de repetições TTAGGG. Os telômeros protegem as extremidades dos cromossomos, previnem recombinações e fusões, e asseguram a completa replicação do cromossomo durante a divisão celular (HAYFLICK, 1979; TAYLOR *et al.*, 1996; SHARPLESS & DEPINHO, 2004; SOUZA SOBRINHO, *et al.*, 2012; FADRI-MOSKWIK *et al.* (2013) BAR & BLASCO., 2016).

A integridade e estabilidade dos cromossomos é um dos principais fatores que devem ser mantidos para um bom funcionamento e multiplicação de um organismo (SOUZA SOBRINHO *et al.*, 2009). Quando há um grande encurtamento dos telômeros, as células param de se dividir.

Os telômeros desempenham um papel crítico na manutenção estável do genoma e na prevenção de doenças

associadas ao envelhecimento prematuro e ao desenvolvimento de neoplasias. A ausência de um mecanismo que mantenha sua integridade, leva a um comprometimento da proliferação celular, sendo possível fusões de cromossomos e aberrações que levam a processos cancerígenos (ZACCAGNINI *et al.*, 2005; FABRI-MOSKWIK *et al.*, 2013).

A enzima responsável pela síntese do telômero é conhecida como telomerase, uma DNA polimerase que contém um componente RNA que sintetiza a repetição DNA do telômero, compensando a perda dos telômeros durante a divisão celular. É uma transcriptase reversa especializada que pode ser associada com imortalização celular e câncer. Esta enzima é fundamental para o controle da proliferação celular e da homeostase tecidual e pela manutenção do comprimento do telômero. Foi descrita pela primeira vez em 1985, sua atividade está ausente na maioria das células somáticas humanas normais e presentes em quase todas linhagens de células tronco, imortais, germinativas e em aproximadamente 90% dos tumores humanos (KIM *et al.*, 1994; RAMIREZ *et al.*, 1997; MERGNY *et al.*, 2002; MO *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2016).

A capacidade finita de replicações celulares é ultrapassada por células imortalizadas, que reativam a telomerase, sugerindo que a progressão de doenças malignas depende de sua reativação, e que um agente inibidor dessa enzima poderia ser uma droga antitumoral efetiva (PIATYSZEK *et al.*, 1995; HAHN *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2006; JAFRI *et al.*, 2016).

Inibidores de telomerase estão sendo avaliados, entre eles, o azidotimidina-trifosfato, zidovudina (AZT), sendo provado que o uso dessa droga inibe, *in vitro*, a ação dessa enzima, associada a uma importante redução dos terminais teloméricos em diversos tipos de neoplasias tais como bexiga, colon, mama, adenocarcinomas e leucemias, entre outros (PARSONS, 2003; BLACKBURN & STRAHL, 1996; BROWN *et al.*, 2003; MO *et al.*, 2003; FALCHETTI *et al.*, 2005; GOMEZ *et al.*, 2012).

Caracterizar mecanismos de manutenção dos telômeros e telomerase e a compreensão de como problemas em sua regulação contribuem para doenças humanas são importantes para o desenvolvimento de novas terapias. Devido a isso, é fundamental a análise científica da ação do AZT na atividade da telomerase em culturas celulares primárias e de linhagens de melanoma humano.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a ação do AZT na expressão gênica e na síntese proteica da telomerase em células de melanoma metastático humano.

LITERATURA

3. LITERATURA

HAYFLICK (1979) realizou cultura de células humanas e células animais e afirmou que elas estão predestinadas a sofrer um irrevogável decréscimo funcional. Essas mudanças, decorrentes da idade, ocorrem em todo o organismo. Em seus experimentos, ele constatou que quando fibroblastos humanos são cultivados, mantém uma população viável de aproximadamente 50%, porém, esta porcentagem é inferior em células derivadas de doadores mais velhos sendo possível que seja uma correlação direta entre os alcances máximos de vida de várias espécies e a população potencial de suas células.

TAYLOR *et al.* (1996) descreveram que telômeros são as regiões terminais dos cromossomos lineares, e em células somáticas normais os comprimentos dos telômeros encurtam com divisões sucessivas das células. Em seus estudos, afirmaram que as extremidades dos cromossomos onde se localizam os telômeros são constituídas de seqüências de nucleotídeos repetidas (TTAGGG) e são importantes na estabilização do cromossomo durante sua replicação. Descreveram a telomerase, como sendo uma enzima ribonucleoproteica, que mantém o comprimento dos telômeros em células imortais e em células germinativas. Embora presente em tecidos humanos fetais, pouco depois do nascimento, a atividade da telomerase não é detectável, exceto em células germinativas, hematopoéticas e tumores

primários humanos. Neste estudo, eles demonstraram que atividade da telomerase estava presente em 73 de 77 carcinomas celulares basais, 15 de 18 carcinomas de pele cutâneos não metastáticos, em 6 de 7 melanomas cutâneos, contrastando com níveis extremamente baixos detectados em peles protegidas do sol. A atividade da telomerase pôde ser encontrada em lesões inflamatórias da pele, isto indicou que sua atividade nem sempre correspondia ao fenótipo maligno. Além do mais, foi demonstrado que essa atividade estava presente junto à epiderme do prepúcio de recém-nascidos, sugerindo sua expressão essencialmente por células na epiderme. Foi encontrado nível mais elevados de atividade da telomerase em pele exposta ao sol comparadas com pele não exposta, sugerindo que fatores ambientais podem modular a atividade da telomerase.

MERGNÝ *et al.* (2002) afirmaram que a atividade da telomerase está ausente na maioria das células somáticas humanas normais e acreditam que a senescência do telômero é guiada por uma estrutura que fornece uma função de supressão de tumor. Este sistema preventivo pode ser contornado por células cancerígenas que promovem a reativação de um mecanismo de manutenção do telômero, a telomerase, que permite a reparação do DNA da célula. Mas estas estruturas especializadas apresentam um problema quando iniciam a duplicação, o DNA telomérico progressivamente se desgasta a cada seqüência de divisão em células que não expressam telomerase, devido às características as quais a telomerase é

expressa em células malignas, mas não em todas células somáticas, os autores indicam que os telômeros e a telomerase podem ser propostos como alvos atraentes para a descoberta de novos agentes antineoplásicos.

BROWN *et al.* (2003) investigaram os efeitos de inibição da telomerase usando AZT em linhagens de célula humana com neoplasia coloretal na presença e ausência de 5- fluorouracila (5-FU) e células HT-29, eles mediram a atividade da telomerase usando protocolo de amplificação e repetição de telomerase. O comprimento do telômero foi determinado por análise *Southern*, e os efeitos de citotoxicidade do AZT foram analisados por microtitulação colorimétrica. Tanto o AZT como sua combinação com o 5-FU inibiu a telomerase das células HT-29. As células foram cultivadas com 125 μ M de AZT por 91 dias. A análise do *Southern* revelou um desgaste do telômero ocorrido neste período. A exposição a 125 μ M de AZT resultou em leve redução de sua viabilidade (10%). No entanto, a presença de AZT aumentou citotoxicidade de 5-FU, sugerindo que os efeitos destas duas drogas são sinérgicos.

PARSONS (2003) afirmou que nas células somáticas, é natural que o telômero sofra uma redução durante seu ciclo de vida, sendo sinal de senescência e que a determinação laboratorial dos níveis da telomerase é feita através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR), usando iniciadores específicos para o mRNA de hTERT, gene ativador da telomerase, permitindo o estudo do grau de expressão que é

diretamente relacionado a quantidade de mRNA sendo possível determinar dosagens de telomerase muito baixas até mesmo em tecidos somáticos adultos. Como a telomerase funciona como uma transcriptase reversa, os agentes inibidores da transcriptase reversa estão sendo testados, entre eles, o azidotimidina-trifosfato, *zidovudina* (AZT), sendo constatado que o uso dessa droga inibe, *in vitro*, a ação da telomerase com importante redução dos terminais teloméricos.

MO *et al.* (2003) descreveram a telomerase como responsável pela síntese do telômero, e que ela é expressa em aproximadamente 90% dos tumores em células humanas, mas raramente em células somáticas normais. Em seus estudos, avaliaram a hipótese de se encurtar simultaneamente o telômero e a inibição da telomerase, o que resultaria em tumores seletivos. Em células humanas positivas para telomerase, de faringe, o *paclitaxel*, droga usada contra alguns tipos de neoplasias, causa redução do telômero e apoptose. A expressão anti-senso ao componente hTert inibiu atividade de telomerase, encurtando o telômero, resultando em uma taxa de crescimento reduzida da célula, com maior sensibilidade ao *paclitaxel*. Estes resultados demonstraram que uso combinado de agentes, como o AZT, apontaram tanto para o telômero como para telomerase, como local de atividade sinérgica seletiva para tumores.

CHUDNOVSKY, KHAVARI, ADAMS, (2005) caracterizaram o melanoma como um tipo de câncer derivado de células que fornecem pigmentação. Somente nas últimas quatro

décadas, a incidência de melanoma aumentou mais rapidamente que qualquer outra neoplasia maligna nos Estados Unidos. O primeiro relato de melanoma foi localizado nos escritos de Hipócrates, 460 AC. No entanto, somente em 1806, quando René Laennec descreveu "la melanose" para a Faculdade de Medicina de Paris, que a doença foi caracterizada em detalhes. William Norris sugeriu que o melanoma seria hereditário em um manuscrito de 1820, descrevendo uma família com numerosas pintas e vários membros de família com lesões de metástase. O melanoma se desenvolve a partir da transformação maligna de melanócitos, as células que produzem pigmento e são localizadas na camada basal da epiderme humana.

OLIVEIRA *et al.* (2005) em um trabalho pioneiro, estabeleceram um modelo experimental de cultura de células primárias de melanoma metastático por punção aspirativa por agulha fina (PAAF), utilizando para isso, duas culturas primárias que foram desenvolvidas a partir de pacientes submetidos à excisão de lesões metastáticas e identificadas por imunohistoquímica, utilizando marcadores S-100 e MB-45, específicos para melanoma. Sua técnica ofereceu vantagens relacionadas à pequena morbidade e invasibilidade, além de ser possível durante o tratamento do doente, que a mesma lesão possa ser puncionada sequencialmente.

ZACCAGNINI *et al.* (2005) discorreram sobre a disfunção do telômero, que contribui para a redução da viabilidade celular, alterando sua diferenciação e prejudicando

sua resposta e regeneração. Avanços recentes indicam que a atividade da telomerase confere um fenótipo pro-angiogênico para as células do endotélio e para seus precursores. Os pesquisadores investigaram se a telomerase contribui para a regeneração do tecido e para o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e concluíram que VEGF induziu angiogênese e o aumento de expressão de TERT (transcriptase reversa da telomerase) e da atividade da telomerase em músculos do esqueleto e células endoteliais. A descoberta de TERT em células ativadas identificou-os como alvos de VEGF durante regeneração de músculo.

CARVALHO *et al.* (2006) afirmaram que a atividade da telomerase está presente em linhagens de células imortais, como o melanoma, sendo esta uma enzima que poderia ser utilizada como marcador no próprio tecido tumoral e que está sendo muito estudada nas últimas duas décadas em diversos tipos de tumores. Nesse estudo concluíram que houve diferença estatisticamente significativa da atividade da telomerase comparada nos grupos de melanoma, pele adjacente, lesão melanocítica benigna e pele controle, aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis, tanto na amostra total quanto nas pareadas, segundo o sexo, a faixa etária e o tipo de pele. Houve diferença estatisticamente significativa entre a atividade da telomerase e a presença de ulceração, da permeação vascular e o índice mitótico.

HUMER *et al.* (2008) investigaram a inibição do crescimento celular de melanomas *in vitro* e *in vivo* por AZT.

Discorreram em seu artigo que esta neoplasia além de ser a mais agressiva, em relação a outras da pele, possui um aumento alarmante na incidência mundial. Afirmaram que apesar de progressos recentes no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratar o melanoma, o índice de sobrevivência é ainda muito baixo. Descreveram o AZT como uma droga útil no tratamento contra o HIV, que originalmente foi desenvolvida como um agente antineoplásico. Relataram a utilização do AZT e sua combinação com outras drogas em trabalhos descritos na literatura em diversas células tumorais, tais como linfoma, cólon e colorretal, em que foi provado seu efeito antiproliferativo nas células, não havendo nenhum estudo em melanomas humanos. Caracterizaram o AZT como análogo de timidina, que posteriormente é incorporado no DNA e que as células neoplásicas possuem uma elevada atividade de timidina e capacidade proliferativa, sendo mais sensíveis ao AZT além desta droga agir como um inibidor de transcriptase reversa. Selecionaram três linhagens celulares de melanomas e analisaram os ciclos celulares, apoptose e o seu potencial efeito inibitório no crescimento celular pelo AZT. A suplementação do AZT variou de 10 a 500 μ M, em triplicata, por um período de 72 horas, com indução a apoptose a partir de 300 μ M, e da cisplatina, agente antineoplásico, em concentrações variadas. Seus resultados revelam que o efeito inibitório do AZT resulta de uma supressão do ciclo celular na fase S e que concentrações maiores da droga induzem a apoptose e efeitos citotóxicos. Demonstraram em seus

estudos que a associação de AZT com cisplatina resultou em maior eficiência na inibição do crescimento celular do que a administração de uma das drogas isoladas. Utilizaram também camundongos imunossuprimidos xenotransplantados com células de melanomas, tratados com 40mg/kg de AZT ao dia, por três semanas, aplicados no ombro esquerdo de cada animal, comparados ao grupo controle, que recebeu solução salina, apresentaram um crescimento tumoral inferior.

SOUZA SOBRINHO *et al.* (2009) em seu estudo, caracterizam o melanoma como um tipo de câncer derivado de melanócitos, com alta capacidade metastática, mesmo nas fases iniciais, visto que sua invasão e disseminação podem ser consideradas uma prerrogativa inata deste tipo celular. Sua origem, na maioria das vezes é na pele, embora sendo possível seu aparecimento em membranas da mucosa e bulbo ocular. Discorrem que o processo de transformação dessas células envolvem várias alterações, como proliferação descontrolada, predisposições genéticas, exposição à radiação solar e traumas físicos em nevos pré-existentes. Apontam para as dificuldades inerentes de culturas primarias desse tipo de célula e sua importância para novos estudos relacionados aos efeitos de drogas sobre esse tipo de tumor, além de relacioná-lo com as extremidades dos telômeros e sua perda de informações genéticas, produzindo com isso, aberrações cromossômicas, sendo vital estudos sobre os mecanismos de regulação dessa enzima em seres humanos.

FLACH *et al.* (2011) verificaram o papel das interações tumorais na progressão de estroma, que em geral, é bem aceita, mas o seu papel em tratamentos é pouco conhecido. Atualmente é aceito que os tumores são constituídos de complexas e dinâmicas misturas celulares cancerígenas, como fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imunológico que interagem umas com as outras em seu microambiente, favorecendo as condições que impulsionam a progressão de tumores. O estudo é direcionado a células do estroma (suporte e sustentação à célula) e fatores do estroma (por exemplo fibronectina e sua importância na progressão tumoral, visto que também foram associadas a resistência à drogas. Desenvolveram uma abordagem integrada para compreender o papel dessas células estromais, fatores no crescimento e manutenção dos tumores, bem como o seu impacto potencial sobre a resistência ao tratamento, especificamente na aplicação em melanoma. Usaram um conjunto de ensaios experimentais que mostraram que as células de melanoma podem estimular a união de fibroblastos e ativá-los, o que resultou em crescimento de células de melanoma, fornecendo ambas as proteínas da matriz extracelular, estruturais e químicas de suporte (fatores de crescimento). Motivados por estes resultados experimentais, construíram um modelo de compartimento e usaram-no para investigar os papéis de ativação do estroma e da agressividade e crescimento do tumor além de investigarem o desempenho dos fibroblastos na resistência ao tratamento do melanoma e do

fenômeno clinicamente difundido, onde um paciente apresenta resistência a uma droga específica, sendo excluído do tratamento. Seu modelo prevê que terapias direcionadas, aceleram a progressão do tumor, devido a ocorrência de resistência.

ASCHACHER *et al.* (2012) Analizaram o uso combinado de dois inibidores antivirais na transcriptase reversa, o AZT e o *Didanosina*, induzindo efeitos anticancerígenos em concentrações baixas. Uma característica da sobrevivência de células tumorais é a manutenção dos telômeros alongados. Sabe-se que os inibidores da transcriptase reversa antivirais (ITRs), tais como a azidotimidina (AZT) e didanosina (DDI) promovem o encurtamento dos telômeros e em altas concentrações, são potencialmente tóxicos. A hipótese dos autores é que essas drogas podem ter efeitos sinérgicos que permitam o sucesso da terapia em baixas concentrações, não apresentando citotoxicidade. Eles analisaram os efeitos biológicos do AZT e DDI em níveis de concentrações que correspondem aos níveis de plasma mínimos alcançados durante o tratamento do vírus da imunodeficiência em humanos, reavaliações a longo prazo, com doses baixas de AZT e DDI induziram a uma redução significativa dos telômeros nas linhagens celulares HCT-116, SKMEL-28, *MelJuso* e de *Jurkat*. O tratamento de células com ambos inibidores, levaram a um acúmulo significativo de γ H2AX (proteína gama), a fosforilação de p53, e a apoptose celular em todas as linhagens. Relatam que uma única aplicação destes inibidores, com baixa dose, foram associadas a um

crescimento significativamente reduzido de linhagens HCT-116, Skmel28, *meljuso* e jurkat (derivadas de linfócitos T) em ratos. Esta atividade antiproliferativa do uso combinado de AZT e DDI em concentrações baixas, clinicamente aplicáveis, tornam possíveis ensaios clínicos em tumores humanos sólidos. Também, relataram em seus estudos que a associação dos dois inibidores promoveram um aumento substancial de apoptose em todas células tratadas, em contraste, quando analisaram a ação de inibidores separadamente, não houve um aumento significativo de apoptose, quando comparados ao grupo controle.

GOMEZ *et al.* (2012) consideraram que a telomerase é uma transcriptase reversa muito especializada e a manutenção do comprimento telomérico é determinado por esta enzima específica. Afirmaram que a holoenzima da telomerase humana é uma ribonucleoproteína composta por uma subunidade catalítica, hTERT, um componente de RNA, hTR, e um grupo de proteínas associadas, sendo que a telomerase é normalmente expressa em células embrionárias, mas silenciada durante a vida adulta, porém, a enzima é reativada em cerca de 85% de tumores sólidos. Nesta observação, descrita em seu trabalho, apontam a telomerase como um alvo potencial para o desenvolvimento de drogas para fins terapêuticos. Além da identificação de que a hTERT tem uma função catalítica, sendo necessários estudos associados a inibição da telomerase com o inibidor de transcriptase reversa do HIV azidotimidina (AZT). Eles demonstraram que o AZT liga-se preferencialmente aos

telômeros, inibindo com isso a telomerase e ocasionando o aumento da senescência celular do tumor, o que levou as células originadas do adenocarcinoma mamário a apoptose após tratamento com AZT. Apontam, desde então, que vários estudos com o AZT foram realizados, objetivando a inibição da telomerase com potencial estratégico e clínico para terapias antitumorais. Discorrem que essa avaliação corrobora com o consenso atual visando tratamentos futuros para inibição da telomerase por AZT.

SOUZA SOBRINHO *et al.* (2012) avaliaram a atividade da telomerase de células de melanoma HS839.T submetidas a ação do AZT, cultivando-as em triplicata, com diferentes concentrações, de 50, 100 e 200 μ M, por 24 e 48 horas e seus efeitos, comparados ao grupo controle, sendo a atividade da telomerase detectada por PCR e a proliferação celular por MTT, tendo como resultado a ausência de inibição da atividade da telomerase e alteração na proliferação celular nas concentrações e tempos propostos.

FADRI-MOSKWIK *et al.*(2013) discorreram em seu trabalho que os telômeros são áreas de heterocromatina constitutiva compostas de repetições TTAGGG localizados nas extremidades dos cromossomos lineares e que eles desempenham um papel crítico, mantendo a prevenção do genoma contra o envelhecimento prematuro e câncer. Afirmam que para caracterizar mecanismos de manutenção dos telômeros, é necessário uma compreensão de como sua desregularização

contribuiu para o desenvolvimento de doenças humanas e novas terapias. Destacam que os mecanismos fundamentais à manutenção do telômero são indutores de células a um processo neoplásico. Em contraste, estudos recentes sobre o mecanismo de manutenção dos telômeros, sugerem que desequilibrar a estabilidade telomérica, interferindo com os mecanismos alternativos de síntese ou de proteção do telômero, podem também produzir novas estratégias para o tratamento de câncer.

NIEZGODA *et al.* (2015) reconhecem que ao longo das últimas décadas, a incidência de melanoma aumentou. De acordo com os dados fornecidos pela OMS cerca de 132.000 melanomas estão sendo diagnosticados a cada ano em todo o mundo. Relatam que o melanoma é o quinto tipo de tumor mais comum nos Estados Unidos, em homens e mulheres, de acordo com os dados levantados pelo Instituto Nacional do Câncer, cerca de 73.870 novos casos de melanoma foram diagnosticados em 2015 e o número de mortes causadas pela doença chegou a 9940. Afirmam que a incidência do melanoma varia de acordo com o grupo étnico, sendo responsável por cada grupo de 100.000 diagnosticados: 1 caso para pessoas negras, 4 em hispânicos (latinos), e 25 em brancos não-hispânicos anualmente. Os pacientes são diagnosticados com melanoma com a idade média de 64 anos, no caso de homens e 57 anos para as mulheres. Informam que a grande maioria dos melanomas são diagnosticados em uma fase precoce; com isso, em sua maioria,

os casos são curáveis. O tratamento do melanoma varia dependendo do estágio clínico, sendo a excisão local, no estágio clínico I, isto é com a doença localizada, mas com lesão de espessura menor que 1mm. Se a lesão primária apresentar espessura maior que 1 mm além da excisão local existe a necessidade de fazer a pesquisa do linfonodo sentinela.

PARREIRAS *et. al.* (2016) Apontam, que o melanoma é um tumor agressivo cuja incidência vem aumentando em todo mundo e que em 2015, estimou-se 73.870 novos casos da doença e aproximadamente 9940 mortes por melanoma nos Estados Unidos da América. Discorrem que no Brasil, os registros de bases populacionais não exprimem a realidade do problema, especialmente quando dados como a presença de dor é requerida, comenta que na mesma proporção que a incidência de melanoma aumenta, espera-se que os problemas relacionados possam estar subestimados e subtratados. Sabe-se que a dor em pacientes com câncer é complexa e multifatorial, chamada de “Dor Total”, pois abrange aspectos fisiopatológicos diversos (dor nociceptiva, causada por estímulo doloroso, e neuropática, lesão ou patologia somatossensorial além de associar-se a toda dimensão do sofrimento. No melanoma, afirma, essa condição é observada com muita evidência, pois é uma neoplasia com elevada mortalidade e acometimento de órgãos diversos, especialmente a pele, interferindo diretamente com a autoimagem do paciente. Pode evoluir com feridas oncológicas e conseqüentemente

afastamento social, solidão e medo. De acordo com o autor, todos esses aspectos estão relacionados diretamente à complexidade da dor apresentada pelos portadores de melanoma. A etiologia da dor no melanoma pode estar associada a diversos fatores, como a presença de uma lesão, as reações inflamatórias locais no tumor e em outros tecidos e a compressão crônica de tecidos adjacentes. Pode também estar relacionada ao tratamento, à quimioterapia, à ressecção cirúrgica da lesão, à biópsia do linfonodo sentinela, à linfadenectomia, ao edema consequente, à perfusão isolada de membro e às metástases. Contudo, afirmam que todos esses fatores estarão inevitavelmente relacionados aos aspectos psicossociais e ao impacto da doença na qualidade de vida destes pacientes. Alertam para um dado pouco conhecido, a dor crônica advinda de procedimentos cirúrgicos associados ao tratamento do melanoma. Em geral, os pacientes são submetidos à biópsia das lesões primárias ou metastáticas com o propósito de estabelecer o diagnóstico, de ampliar as margens de segurança, de biopsiar o linfonodo sentinela (BLS) para avaliar disseminação linfonodal e/ou de se realizar uma linfadenectomia de acordo com o estado da cadeia pesquisada. Além disso, afirmam que em alguns casos, procedimentos subsequentes são indicados para ressecção e biópsia de recidivas ou metástases; há também procedimentos paliativos, como perfusão isolada de membros, que são utilizados no controle da doença. No entanto, alertam que faltam dados epidemiológicos que favoreçam uma abordagem mais efetiva e

medidas para prevenção da dor durante todas as etapas do tratamento dessa população.

HAN *et al.* (2016) afirmam que a maioria dos pacientes com melanomas cutâneos são curados com ampla excisão local. No entanto, novas evidências identificaram o uso de biópsia nos linfonodos sentinela, visto que de 15% a 20% dos pacientes desenvolvem metástase local. Apontam que o fator mais importante é a presença ou ausência de micrometástases na fase inicial, particularmente em espessuras intermédias. Em sua revisão, eles examinaram o desenvolvimento de melanoma como um meio de determinar a situação do paciente através do exame de seus nódulos e a eficácia da biópsia do linfonodo sentinela em pacientes com melanoma, além do estudo da biologia de melanoma metastático dos linfonodos sentinela. Discorrem que ensaios randomizados prospectivos têm orientado o desenvolvimento de diretrizes para práticas recomendadas para utilização de biópsias de linfonodos, apontando um elevado valor em seu prognóstico, decorrentes do avanço progressivo de tecnologias moleculares e cirúrgicas e que baseados em aspectos técnicos do diagnóstico, a identificação dos linfonodos regionais continuam evoluindo.

NAM *et al.* (2016) preconizam em seus estudos que o melanoma cutâneo é a causa mais comum de morte decorrente de câncer de pele. A incidência e características clínicas de seus subtipos diferem significativamente de acordo com sua biologia, particularmente, raça, sexo além de fatores ambientais. A

principal localização de desenvolvimento do melanoma cutâneo varia significativamente entre os grupos raciais. Em geral, a região da cabeça e pescoço e região do tronco são os locais mais comuns de melanoma em homens caucasianos, e a extremidade inferior em mulheres caucasianas é o local mais comum. Nestas populações, o melanoma ocorre na região acral, porém, raramente nos dedos, embora, na Ásia Oriental, o melanoma ocorre com mais frequência na região acral. Afirmam que muitos estudos têm demonstrado que a exposição à luz ultravioleta em nevos benignos ou atípicos e a sensibilidade ao sol podem causar melanoma cutâneo. Além disso, propõem que traumas anteriores em nevos, como exposição química e tabagismo têm sido relatados como fatores de risco para o melanoma acral lentiginoso. Tem sido sugerido que a etiologia de melanoma acral pode ser diferente de outros melanomas. Seus estudos podem servir como um ponto de referência para determinar as estratégias de tratamentos no futuro.

MOSKWIK *et al.* (2016) asseguram em seu estudo que telômeros são áreas de heterocromatina compostas por sequências repetidas TTAGG localizadas nas extremidades dos cromossomos lineares. Eles desempenham um papel fundamental em manter o genoma estável, além de prevenir doenças cancerígenas e envelhecimento precoce. Destacam que caracterizar os mecanismos de manutenção dos telômeros, assim como compreender como sua desregulação contribui para o surgimento de doenças em humanos, são etapas importantes para

o desenvolvimento de novas terapias. Afirmam que o alongamento do telômero é um mecanismo-chave responsável para a manutenção da imortalidade replicativa em células, discorrem também sobre um leque de potenciais terapias que tem seu foco voltadas a segmentos da telomerase, por outro lado, estudos recentes sugerem que desequilibrar a estabilidade do telômero, interferindo em mecanismos reguladores alternativos da síntese e proteção dos telômeros, podem também originar novas estratégias para o tratamento de tumores. Nesta revisão os autores focam em novos reguladores que promovem a síntese ou mesmo a manutenção dos telômeros, tais como o *DNA telomérico G4*, o *complexo CST*, o *T-loop* e *shelterins*, sendo discutido seu potencial como alvos para intervenção quimioterápica antineoplásica no futuro.

WAGHORN *et al.*, (2017) afirmam que a telomerase esta expressa em aproximadamente 85% dos tumores malignos e ausente nas maioria das células normais, tornando-a um alvo atrativo para novas terapias. No entanto, o período de latência entre o início da inibição da telomerase e a interrupção do crescimento tumoral, torna a inibição direta desta enzima um método de tratamento atenuante. Contudo, demonstraram que a inibição da telomerase aumenta a radiosensibilidade das células tumorais. Para investigar essa nova estratégia de inibição simultânea da telomerase, sintetizaram inibidores marcados radioativamente, com isso, estudaram os seus efeitos na sobrevivência das células tumorais. Um análogo denominado MST-

312, marcador de telomerase foi utilizado, resultando em um IC50 (índice de concentração, média de inibição de um composto) de 1,58 μ M. Verificaram que os ensaios clonogênicos apresentaram um efeito de dose dependência entre o MST-312 e a sobrevivência celular em uma linhagem positiva para telomerase, denominada MDA-MB-45.

MÉTODOS

4. MÉTODO

Delineamento do estudo

- Primário
- Experimental
- Prospectivo
- Analítico
- Centro único.

Critérios de inclusão: indivíduos de ambos os sexos, acima de 18 anos, portadores de melanoma cutâneo com grande massa tumoral e que foram operados.

Critérios de exclusão: Contaminação das amostras celulares em qualquer etapa do estudo.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo sob o número 1533/07, Emenda/atualização CEP: 02/2013 (anexo 1).

Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão descritos acima, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice).

4.1 Cultura de células

Trabalho realizado no Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, experimental, *in vitro*, realizado em triplicata, amostras de 5 pacientes e 1 linhagem, processadas em ambiente de fluxo laminar.

4.1.1 Melanoma HS 839.T

Foram utilizados nesse trabalho células de melanoma provenientes do *American Type Culture Collection* (ATCC - Manassas, USA) denominadas HS 839.T, número de catálogo CRL-7572, descritas pelo fabricante como células semelhante a fibroblastos derivadas da pele de um indivíduo caucasiano, sexo feminino 42 anos, conforme trabalho já publicado (SOUZ SORINHO *et al.*,2012) na Acta Cirúrgica Brasileira.

Os procedimentos para a utilização da linhagem HS 839.T foram realizados de acordo com as orientações descritas pelo ATCC, com modificações, sendo as células cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) e suplementadas com 20% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island NY, USA), 0,02 ml de L-glutamina (Sigma Aldrich, St Louis, USA), 4,5 g/L de glicose (Merck, New Jersey, USA), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Merck, New Jersey, USA), denominado a partir desse momento de meio RPMI completo. Após, foram mantidas em garrafas de cultura de 25cm² com 5 ml do meio de cultura, colocadas na incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%, até alcançarem confluência de 80% da garrafa (MYUNG *et al.*, 2004; UMEMOTO *et al.*, 2006; Souza Sobrinho *et al.*,2012).

4.1.2 Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF)

O cultivo das células primárias de melanoma pela técnica asséptica de PAAF foi baseado no método descrito por Oliveira *et al.*, 2005.

A punção aspirativa por agulha fina foi realizada na sala cirúrgica, em ambiente estéril, com o auxílio de uma seringa de 10ml acoplada a uma agulha 25 x 0,7 mm sendo utilizada para aspirar células dos linfonodos metastáticos, a agulha foi introduzida no nódulo e mantida no interior do mesmo enquanto foi aplicada uma pressão negativa contínua através da seringa. Antes de retirar a agulha, a pressão foi desfeita e o espécime coletado colocado em tubo cônico de 15 ml com 10ml de meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil) no seu interior, esse material seguiu em um intervalo máximo de trinta minutos para o laboratório, onde foi centrifugado durante cinco minutos com velocidade de 1300 g.



Figura1-Punção aspirativa por agulha fina: A agulha foi introduzida no nódulo, sendo aplicada uma pressão negativa contínua através da seringa em linfonodos.

As células foram ressuspensas em 10 ml de meio de cultura RPMI 1640 e novamente centrifugadas na mesma velocidade e intervalo de tempo, para retirar o máximo de impurezas. Após, foram ressuspensas em 5 ml de meio de cultura e colocadas em uma garrafa de cultura de 25 cm², e levadas a incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%, até alcançarem confluência de 80% da garrafa, sendo posteriormente submetidas à ação de tripsina 0,01% (Sigma Aldrich, St Louis, USA), e transferidas para novas garrafas de 25cm², conforme protocolo experimental descrito por OLIVEIRA *et al.*, 2005. Após a quarta passagem, as células foram submetidas a diferentes

concentrações de AZT, em triplicatas e tempos variados, em estudo piloto, comparados sempre a um grupo controle sem adição da droga, sendo a concentração e tempo com melhor resposta descrito na figura 2, submetidas à concentração de 1000 μ M de AZT, no tempo de 5 horas e 24 horas (BLACKBURN & STRAHL, 1996; BROWN *et al.*, 2003; FALCHETTI *et al.*, 2005; HUMER *et al.* 2008),

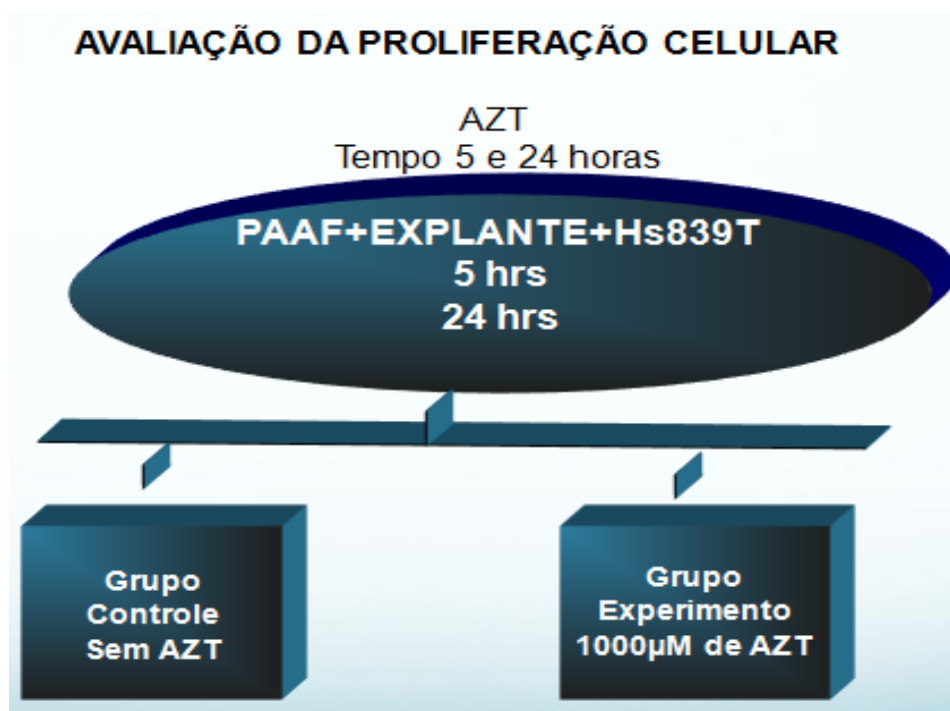


Figura 2 - Descrição dos grupos experimentais.

4.1.4 Técnica de explante

A coleta e cultivo das células primárias de melanoma pela técnica de explante (dissociação mecânica) foi baseado no método descrito por Tucci-Viegas VM *et al.*, 2010, com modificações. Os fragmentos doados pelos participantes do estudo foram coletados no centro cirúrgico do Hospital São Paulo, do setor de melanoma e imediatamente transportados para o Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp.

As amostras coletadas foram alocadas em tubo cônico de 15ml, contendo 10ml de meio de cultura com antibióticos penicilina (100UI/ml; Gibco®, Carlsbad, CA, USA) e estreptomicina (100 µm/ml; Gibco®, Carlsbad, CA, USA) levados ao laboratório, foram agitados manualmente, por 45 segundos, procedimento repetido por três vezes com a troca do meio de cultura, em seguida as amostras foram fragmentadas com tamanho aproximado de 2mm e transferidas para placas de petri de 60mm de diâmetro, previamente preparadas com ranhuras em seu substrato para melhor aderência e alocadas e estufa umidificada a 37°C, e 5% CO₂, até ocorrer a migração e irradiação das células da amostra para as extremidades da placa até alcançarem confluência média de 80% , sendo posteriormente submetidas à ação de tripsina 0,01% (Sigma Aldrich, St Louis, USA), e transferidas para garrafas de 25cm², contendo meio RPMI completo, conforme protocolo experimental descrito por OLIVEIRA *et al.*, 2005.

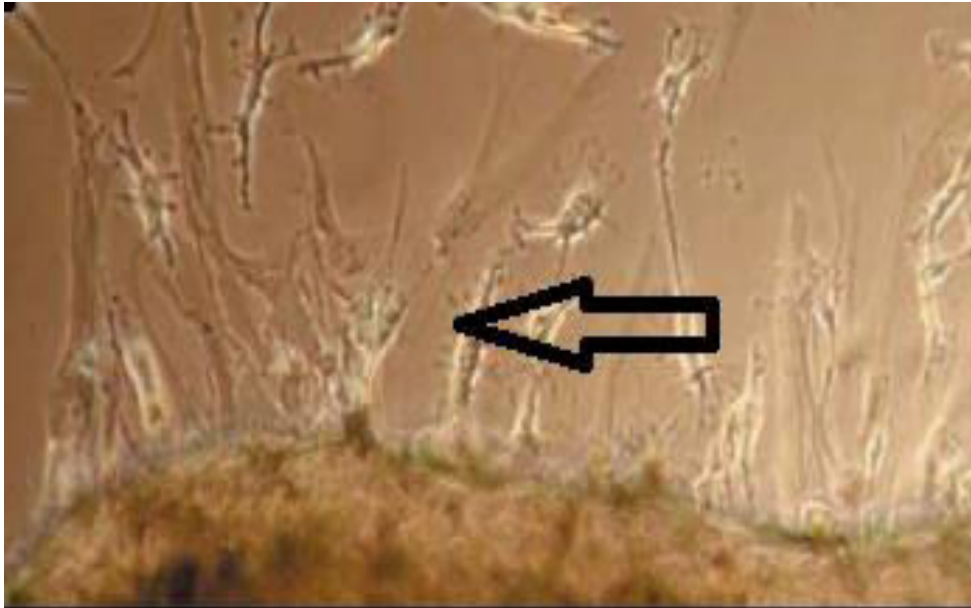


Figura 3- Migração celular do fragmento: A seta indica as células irradiando do fragmento principal para as extremidades, para posteriormente, atingirem confluência na placa de Petri.

4.2 Microtitulação Colorimétrica -MTT

Para a determinação da atividade metabólica das células, foi utilizado o MTT, o sal de tetrazolina (*3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide*) que é absorvido pelas células e reduzido em uma reação mitocôndria-dependente gerando um produto denominado formazano.

Na solubilização das células, o formazano é liberado, podendo ser detectado e quantificado colorimetricamente. A capacidade das células para a redução MTT fornece uma indicação da integridade e atividade mitocondrial que, por sua vez, pode ser interpretada como uma medida de viabilidade e / ou número de células. O ensaio é, portanto, adaptado para uso com

culturas de células em crescimento exponencial, baseado no método de HANSEN, NIELSEN, BERG (1989).

Neste trabalho, 10^4 células/poço foram distribuídas em microplacas de 96 poços com 100 μ L de meio RPMI completo.

As placas foram incubadas a 37°C em estufa, com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂ por 24 horas para permitir a aderência das células. O meio RPMI foi trocado por meio RPMI completo fresco adicionando-se simultaneamente 1000 μ M diluições do AZT.

As células, incubadas novamente a 37°C, por 1 a 8 horas, 24 horas 48 horas e 72 horas e posteriormente, o meio foi substituído por RPMI sem SFB, contendo uma solução de MTT (5mg/ml) e incubadas por 3 horas, sendo posteriormente, aspirado o meio e acrescentados 100 μ l isopropanol acidificado (0,04 N; HCl) em cada poço por 10 minutos para dissolução dos cristais de formazano. A análise procedeu em leitor de placa (SpectraMaxM2) a 450 nm de comprimento de onda, com filtro referencial de 590 nm e a atividade metabólica foi obtida utilizando porcentagem em relação ao controle.

4.3 CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras de células foram avaliadas por citometria de fluxo (figura 4) na quarta passagem, (*Guava Easy Cyte* HT Millipore, Belford MA, USA) técnica usada para análise qualitativa e quantitativa de 3000 eventos por amostras. Cada

evento corresponde a uma célula em suspensão, que no histograma (representação gráfica em colunas e retângulos) de análise bivariada, passa pelo feixe de laser em fila indiana, sendo detectada, o que permite avaliações diversas.

Analisar células individualmente consiste na detecção de uma variedade de estados fisiológicos celulares intermediários que existem numa determinada população, evidenciando assim uma heterogeneidade populacional como características estruturais e funcionais de partículas biológicas. A posterior, os dados são analisados no programa InCyte Software, cujas informações são processadas por meio de gráficos.

4.3.1. Viabilidade e morte celular

Apoptose ou morte celular programada é uma importante via reguladora do crescimento e proliferação celular. Em apoptose, as células respondem a sinais de indução específicos, iniciando processos intracelulares que resultam em mudanças fisiológicas. As principais mudanças são: externalização da fosfatidilserina (fosfolípido essencial que faz parte da constituição das membranas) à superfície celular, clivagem e degradação de proteínas celulares específicas, compactação e fragmentação da cromatina nuclear e perda de integridade da membrana (em estágios tardios).

No início da via apoptótica as moléculas de *phosphatidylserine* (PS), normalmente localizadas no interior da membrana celular, se deslocam para a superfície exterior da

membrana. Nas fases posteriores da apoptose, a membrana da célula perde a sua integridade e começa a fragmentar.

O Guava Nexin Kit inclui anexina-V, uma proteína com afinidade elevada para a PS. A Anexina V-PE do reagente liga-se a PS por translocação para o lado externo da membrana celular. O 7-AAD, um corante de viabilidade, também está incluído no ensaio e foi utilizado como um indicador da integridade estrutural da membrana. O 7-AAD liga-se a dupla hélice no interior da célula após a permeabilização da membrana, o que lhe permite diferenciar as células em apoptose (anexina V-positivo).

As células foram tripsinizadas e a suspensão centrifugada a 300 g por 4 min, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 1 mL de PBS. Este procedimento, ou seja, a lavagem da suspensão de células foi repetida novamente e as células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS em um microtubo de 1,5 ml.

Posteriormente, foi adicionado igual proporção (100 μ L) do reagente Guava Nexin (Millipore).

O microtubo contendo as células e os respectivos reagentes foram incubados durante 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz. A seguir foram acrescentados 200 μ L de PBS e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo Guava easyCyte HT (Millipore, Belford, Massachusetts, EUA) e analisadas no programa InCyte Software.

Imunofluorescência por citometria de fluxo

Após a tripsinização das células essas foram centrifugadas e fixadas utilizando (100 µL) da solução de formalina 0,4% em PBS e mantidas a 4°C até o momento do experimento.

No dia do experimento as células fixadas foram centrifugadas e aspirado a formalina e posteriormente incubado com PBS contendo 0,1 M de glicina e saponina 0,01% em PBS por 10 minutos e lavado duas vezes em PBS.

Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo primário, na diluição descrita abaixo, em PBS contendo 1% de BSA e saponina 0,01% por 90 minutos. Ao final da incubação, as células foram lavadas por duas vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado ao marcador fluorescente correspondente na diluição descrita abaixo em PBS. Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas uma vez em PBS, ressuspensas 300 µL de PBS e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo Guava easyCyte HT (Millipore, Belford, Massachusetts, EUA) e analisadas no programa InCyte Software.

Anticorpos primários:

Anti-Telomerase (Abcam ab32020), monoclonal obtido de coelho na diluição de 1:200 em PBS.

Anti-Melanoma (Abcam ab732), monoclonal obtido de camundongo na diluição de 1:200 em PBS.

Anti-p53 clivada (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-101762) policlonal obtido de coelho na diluição de 1:500 em PBS.

Anticorpos secundários:

Anti-coelho conjugado com PE (Abcam ab97070), na diluição de 1:500 em PBS.

Anti-camundongo conjugado com FITC (Abcam ab98702), na diluição de 1:500 em PBS.

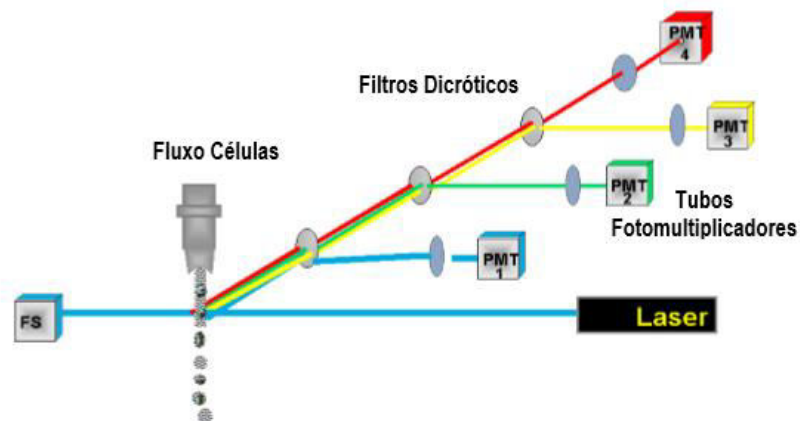


Figura 4- Representação de citômetro de fluxo; esquema de constituição interna, com sistema de lentes (Caprioglio, 2008).

4.3.1 Identificação da p53

As células cultivadas foram tripsinizadas e a suspensão centrifugada a 300 g por 4 min, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de PBS. Este procedimento, ou seja, a lavagem da suspensão de células foi realizada duas vezes. Após a

segunda lavagem as células foram ressuspensas em 600 μ L se PBS. Foi acrescentado Anti-p53 clivada (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) policlonal obtido de coelho na diluição de 1:500 em PBS e Anticorpo secundário anti-coelho conjugado com PE (Abcam ab97070), na diluição de 1:500 em PBS.

As placas contendo as células e os anticorpos foram incubados durante 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz, em seguida foram acrescentados 300 μ L de PBS e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo Guava easyCyte HT e analisadas no programa InCyte Software.

4.3.2 Telomerase

Para a telomerase, foram utilizadas as mesmas diluições descritas, com marcadores primários Anti-Telomerase reverse transcriptase (Abcam Ab32020, Cambridge, United Kingdom) e secundários Anti IgG2b de cabra (FITC), (Abcam Ab98702, Cambridge, United Kingdom).

4.4 Atividade da telomerase RT-PCR

Ensaio da Telomerase

A atividade de telomerase foi medida utilizando o kit de detecção da telomerase *TRAPEZE® RT Telomerase Detection Kit* (Millipore, Bedford, MA). Este é um ensaio *in vitro*

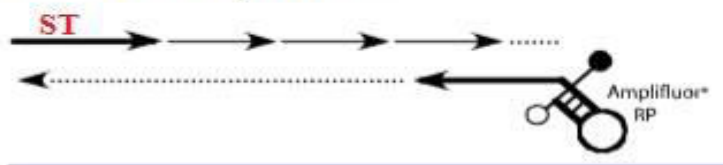
altamente sensível para a detecção fluorométrica e para a quantificação em tempo real da atividade da telomerase utilizando PCR quantitativo (qPCR).

O *TRAPEZE® RT Telomerase* é um kit de detecção utilizando um tampão, dois sistemas enzimáticos utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) e iniciadores Amplifluor® (Uehara *et al.*, 1999). No primeiro passo da reação (Figura 5, linha A), a enzima telomerase adiciona uma série de repetições teloméricas (GGTTAG) sobre a extremidade 3' de um substrato de oligonucleotídeo da Telomerase (ST). Nos passos seguintes (Figura 5, linha B e C), os produtos amplificados são estendidos pela segunda enzima, a Taq Polimerase, utilizando PCR com o ST e iniciadores marcados com fluoresceína Amplifluor® RP (reverso). Isto gera um produto fluorescente com incrementos de 6 pares de bases iniciando com 61 nucleotídeos: 61, 67, 73, 79, etc. A emissão de fluorescência produzida é diretamente proporcional à quantidade de produtos TRAP gerados (Figura 5, linha D).

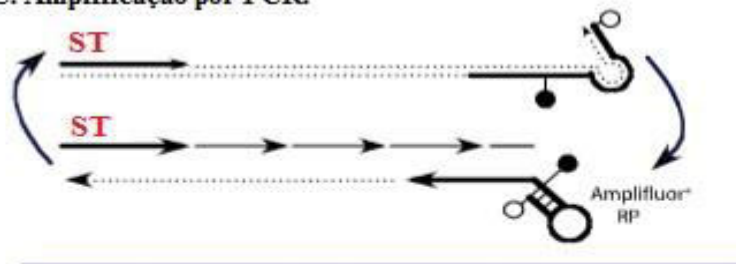
A. Adição de repetições Teloméricas para o Substrato da Telomerase (ST).



B. Síntese da fita complementar.



C. Amplificação por PCR.



D. Acúmulo de produtos TRP fluorescentes.



Figura 5- Esquema do kit de detecção da Telomerase *TRAPEZE® RT*.

Após o tratamento descrito, tanto as células em experimentação quanto as células de controle positivo que constam no kit, foram lisadas em 200 µl de tampão CHAPS. A suspensão celular foi incubada no gelo por 30 minutos e a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 20 minutos a 4°C. As alíquotas de lisado celular (cerca de 1 mg de proteína/poço) foram ensaiadas numa placa de 96 poços de qPCR.

Para uma análise de resultados válida dois fatores devem ser considerados: (1) controles apropriados e (2) a quantidade de extrato celular a ser utilizado. Assim os poços foram acertados para a geração da curva padrão (controle *template* TSR8),

controle negativo (sem amostra), e um controle para eficiência de amplificação do PCR (TSK). Para a curva padrão foi utilizado o TSR8 (*template* controle) ao invés da amostra para gerar a curva padrão. TSR8 é um oligonucleotídeo com uma sequência idêntica ao iniciador ST estendido com 8 repetições teloméricas, AGGGTTAG. Esta curva padrão permite o cálculo da quantidade de iniciadores ST com repetições teloméricas estendidas pela telomerase no extrato celular a ser quantificado.

Os parâmetros para a realização da amplificação por PCR foram: 30°C por 30 min (1 ciclo), 95°C por 2.0 min (1 ciclo) e 45 ciclos de 94°C por 15 seg, 59°C por 60 seg e 45°C por 10 seg (temperatura e estágio para coleta de dados). Os ensaios foram realizados em um aparelho de PCR quantitativo ABI 7500*Fast* (Applied Biosystems, Foster City, CA). A atividade da telomerase (produto total gerado) foi calculada pela comparação dos valores médios de Ct (*cycle threshold*) dos poços contendo a amostra com base na curva padrão gerada pelo *template* controle TSR8.

4.5 ESTATÍSTICA

Os parâmetros de análise foram representados como valores médios ou como porcentagem de aumento relativo ao controle. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão.

A análise estatística dos resultados em citometria e MTT foi realizada usando-se o teste de Anova - Newman-Keuls de

múltiplas comparações, sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Viabilidade celular

MTT

Os resultados apresentados nas figuras 6 e 7 foram utilizados para determinar a concentração do AZT e o tempo de estudo que foram utilizados na citometria de fluxo e RT-PCR.

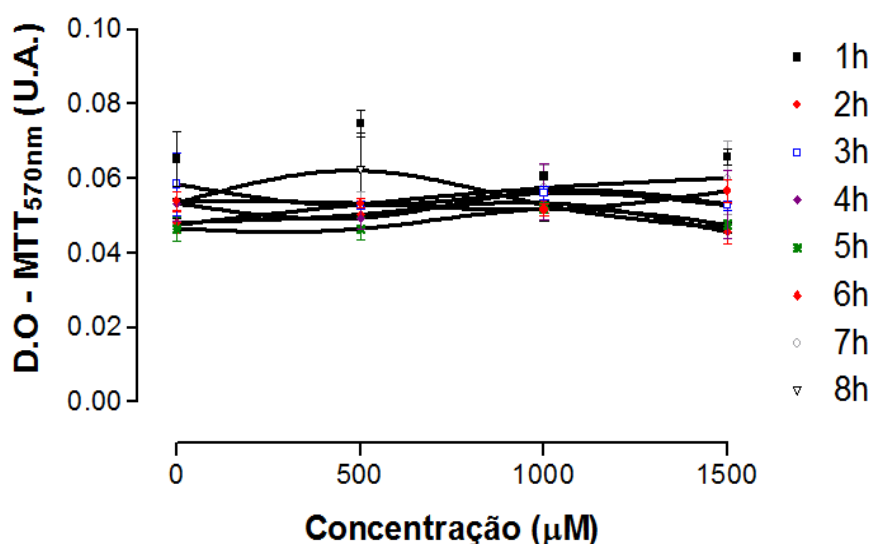


Figura 6- Curva da concentração-resposta do AZT. A curva concentração-resposta do AZT foi avaliada nos intervalos de tempo de 1-8 horas utilizando o método do MTT conforme descrito no item 4.2. A análise estatística dos resultados foi realizada usando-se o teste de Anova - *Newman-Keuls Multiple Comparison Test*. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

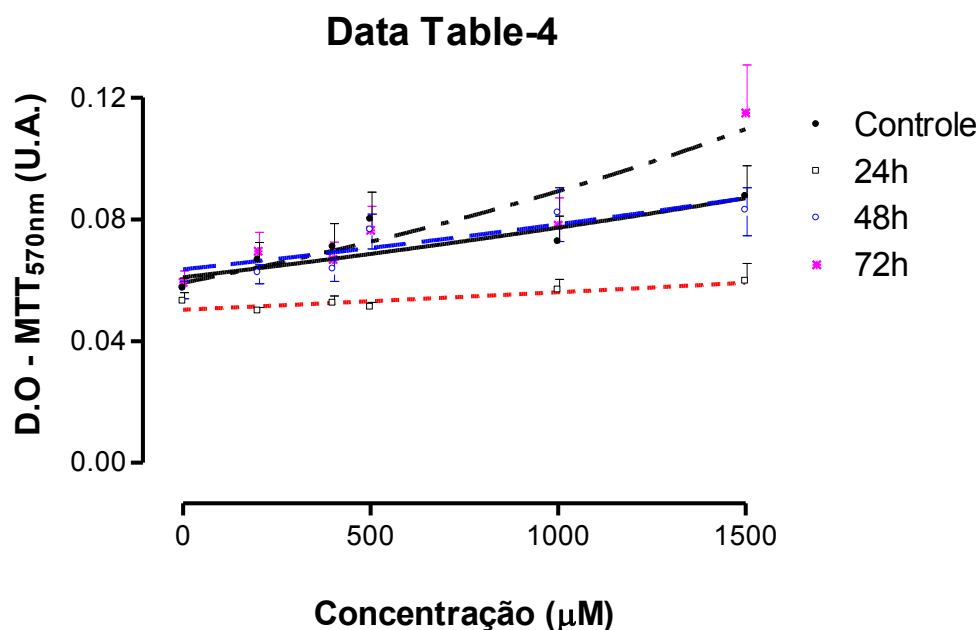


Figura 7- Curva da concentração-resposta do AZT. A curva concentração-resposta do AZT foi avaliada nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas utilizando o método do MTT conforme descrito no item 4.2. A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste de Anova -*Newman-Keuls Multiple Comparison Test*. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

Imunofluorescência por citometria de fluxo

Caracterização das células

A marcação e caracterização das amostras analisadas (Anti-melanoma AC monoclonal [HMB 45+DT101+BC199] Abcam, San Francisco, USA), corroboraram com as informações contidas nos prontuários dos pacientes, sendo 100% melanomas, confirmadas por exames anatomopatológicos das peças cirúrgicas.

Citometria de fluxo

Apoptose

Para análise de células em apoptose, na média das amostras estudadas, não houve diferença estatisticamente significativa, quando comparados os grupos controle e tratados tempo de 5hrs.

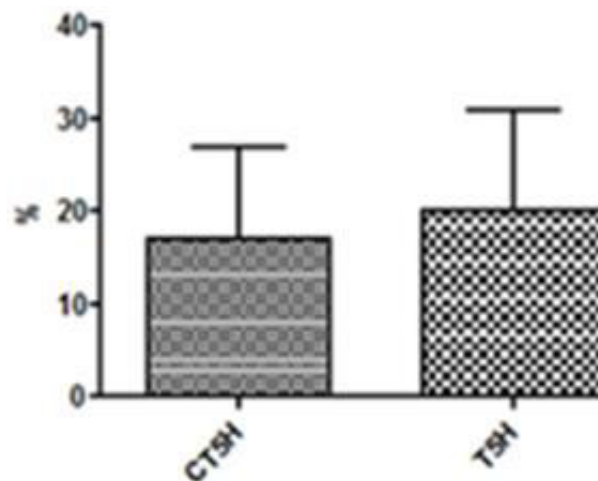


Figura 8. Culturas primárias: Tratamento tempo de 5hrs, 1000 μ M de AZT. A porcentagem da apoptose das células provenientes dos pacientes com melanoma que foram tratadas com AZT por 5 horas foram avaliadas utilizando a citometria de fluxo. A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste t de *Student*. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

Para análise de células em apoptose, na média das amostras estudadas, houve diferença estatisticamente significativa, quando comparados os grupos controle e tratados tempo de 24hrs.

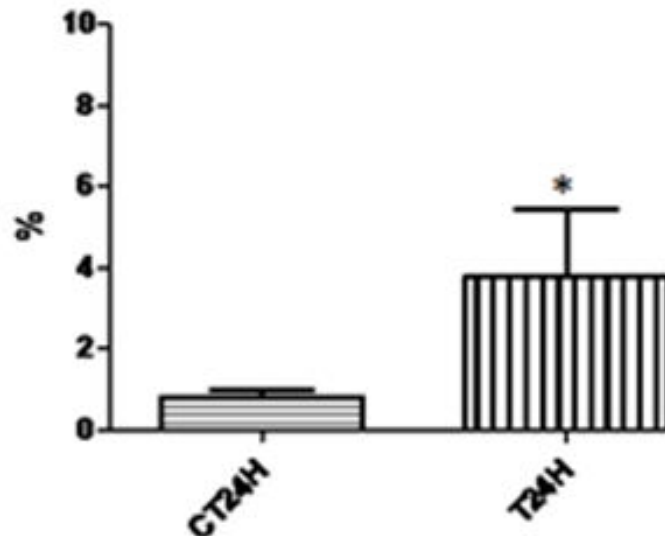


Figura 9- Culturas primárias: Tratamento tempo de 24hrs, 1000 μ M de AZT. A porcentagem da apoptose das células provenientes dos pacientes com melanoma que foram tratadas com AZT por 24 horas foram avaliadas utilizando a citometria de fluxo. A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste t de *Student*. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

Identificação da P53

Para análise da proteína supressora de tumor P53, na média das amostras estudadas, não apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparadas ao grupo controle 5hrs.

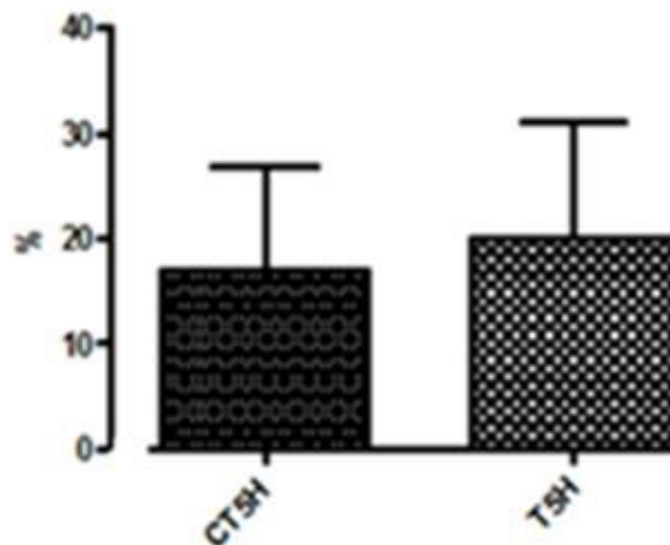


Figura 10- P53. Culturas primárias: Tratamento das células de melanoma: Tempo de 5hrs 1000 μ M de AZT. A porcentagem da p53 das células provenientes dos pacientes com melanoma que foram tratadas com AZT por 5 horas foram avaliadas utilizando a citometria de fluxo. A análise estatística dos resultados foi realizada usando-se o teste t de *Student*. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

A análise da proteína supressora de tumor P53, na média das amostras estudadas, não apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparadas ao grupo controle 24hrs.

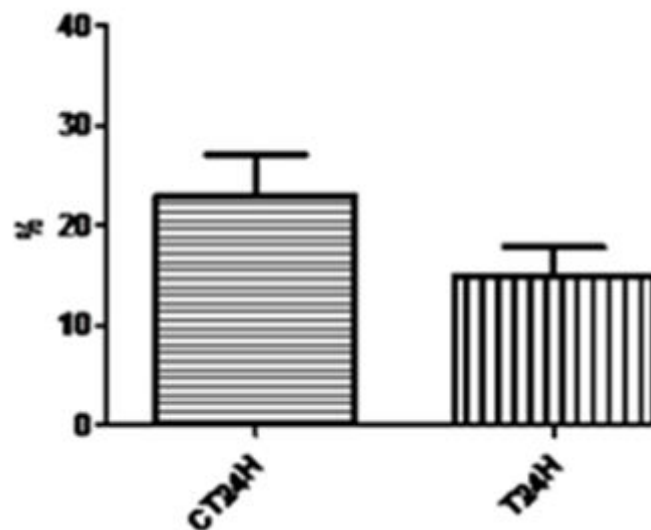


Figura 11- P53. Culturas primárias: Tratamento das células de melanoma: Tempo de 24hrs 1000 μ M de AZT. A porcentagem da p53 das células provenientes dos pacientes com melanoma que foram tratadas com AZT por 24 horas foram avaliadas utilizando a citometria de fluxo. A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste t de *Student*. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

Telomerase

A análise da transcrição da proteína telomerase, na média das amostras estudadas, não apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo controle 5horas.

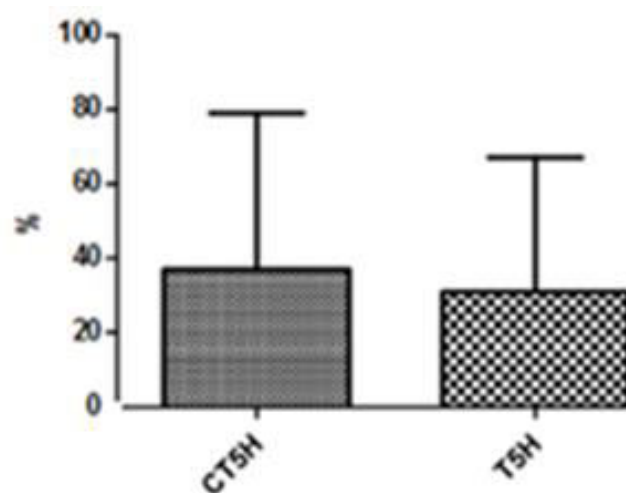


Figura 12- Culturas primárias: Telomerase. Tratamento das células no tempo de 5hrs, 1000 μ M de AZT. Tratadas com AZT por 5 horas. A porcentagem da telomerase das células provenientes dos pacientes com melanoma que foram tratadas com AZT por 5 horas foram avaliadas utilizando a citometria de fluxo. A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste t de *Student*. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

A análise da transcrição da proteína telomerase, na média das amostras estudadas, não apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo controle 24 horas.

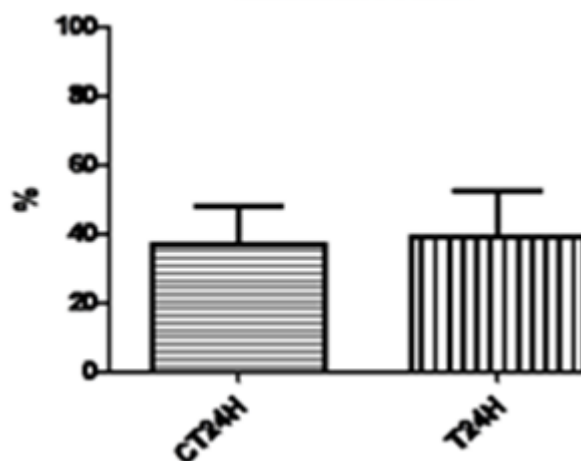
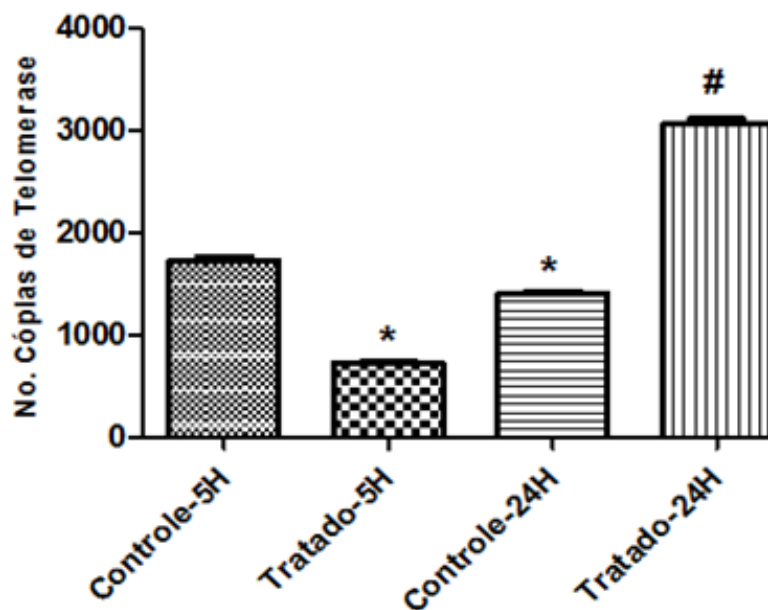


Figura 13- Culturas primárias: Telomerase. Tratamento tempo de 24hrs, 1000 μ M de AZT. A porcentagem da telomerase das células provenientes dos pacientes com melanoma que foram tratadas com AZT por 24 horas foram avaliadas utilizando a citometria de fluxo. A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste t de *Student*. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

Atividade da telomerase RT-PCR

A análise estatística da expressão gênica, correspondente à transcrição da telomerase apontou uma diferença estatisticamente significativa, quando comparados os grupos controle 5h e tratados 5h e controle 24h e tratados 24h.



Número de Cópias de Telomerase					
	PAC1	PAC5*	PAC7	PAC10	PAC13
C	1546	2348	1656	1520	1596
C1000	661	1713	243	919	1016
24H	1308	6065	669	1930	590
24H-1000	3637	802*	1647	2965	3228

Figura 14- RT-PCR telomerase Tratadas com AZT por 5 e 24 horas. A porcentagem da telomerase das células provenientes dos pacientes com melanoma que foram tratadas com AZT por 5 e 24 horas foram avaliadas utilizando-se um aparelho de PCR quantitativo ABI 7500Fast (plied Biosystems, Foster City, CA). A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste Anova -Newman-Keuls Multiple Comparison Test. Sendo os valores de $p \leq 0,05$ considerados estatisticamente significantes.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O melanoma é um tumor heterogêneo, com características ainda não completamente elucidadas, cuja incidência tem aumentado de maneira alarmante, segundo PARREIRAS *et. al.* (2016). Um melhor entendimento da sua biologia e evolução poderiam auxiliar na introdução de novos tratamentos.

Estudos científicos dos efeitos do AZT na atividade da telomerase deste tipo de célula tumoral são essenciais, visto que são cada vez mais numerosos os trabalhos demonstrando que esta enzima pode desempenhar um papel importante no processo de proliferação, senescência e morte celular, através de sua ligação aos telômeros (GOMEZ *et al.* 2012).

Neste estudo, optou-se pela utilização de fragmentos de tecidos doados por pacientes no centro cirúrgico do Hospital São Paulo, durante o tratamento cirúrgico do melanoma, resultantes da ressecção de peças cirúrgicas acometidos pela patologia. Após a coleta, o material seguiu para o laboratório de cultura de células e passou por um processo de isolamento e expansão celular, de acordo com duas técnicas distintas: explante celular (dissociação mecânica) descrita por Tucci-Viegas VM *et al.*, 2010, com modificações e técnica de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), descrita por Oliveira *et al.*,(2005).

Com isso, foi possível manter as condições do experimento de maneira mais fidedigna possível e semelhante ao equilíbrio dinâmico fisiológico e metabólico dos pacientes. Fato que destoa

da maioria dos experimentos que envolvem culturas de células, devido à complexidade e leque de variantes que podem comprometer os experimentos, tais como elevado risco de contaminação das amostras, que passam a multiplicar-se em um ambiente artificial controlado, sensibilidade das células, mau funcionamento de um equipamento de maneira inesperada, entre outros, além de uma equalização do meio de cultura, sais e antibióticos, que precisam ser ajustados para o melhor desenvolvimento das células. Tais situações, inclusive, foram vivenciadas neste trabalho, tendo como consequência, a exclusão de amostras de pacientes, no decorrer dos experimentos, reduzindo a nossa amostra inicial de 10 para 5 pacientes, mais a inclusão de uma linhagem, para verificarmos se a resposta, ou seja, a inibição da telomerase, poderia ter similaridade, independentemente de sua origem ser primária ou não, algo que ficou demonstrado e alocado nos apêndices.

Como padrão ouro, normalmente são utilizadas linhagens de células humanas e de ratos imortalizadas e amplamente comercializadas. Utilizando culturas primárias humanas, com a técnica pioneira desenvolvida e refinada pelo laboratório de cultura de células do programa de pós-graduação em cirurgia translacional da UNIFESP, foi possível a expansão e manutenção de um banco de células de culturas primárias de melanoma humano.

Além destas células, também foram utilizados nesse experimento linhagem de células imortalizadas de melanoma,

como citado acima, adquiridas via *American Type Culture Collection* (ATCC - Manassas, USA) denominada HS 839.T, número de catálogo CRL-7572, derivada da pele com morfologia de fibroblastos de um indivíduo caucasiano do sexo feminino de 42 anos descrita por SOUZA SOBRINHO *et al.*, 2012, Isso garantiu a continuidade desta linha de pesquisa, que vem sendo desenvolvida no programa, e utilizou esta referida linhagem em outro estudo.

As células foram mantidas em garrafas com meio de cultura apropriado e em estufa ajustada a uma temperatura de 36 °C e CO₂ a 5% até atingirem uma confluência média de 80% e realizadas as passagens, subcultivos necessários aos experimentos com o AZT. O efeito do AZT em células tumorais é baseado em sua interação molecular com seu nucleosídeo que, literalmente compete com o nucleotídeo timina das fitas parietais, sendo análogo de timina, causando uma competição e pareamento entre as ligações covalentes, sendo a posterior, incorporado ao DNA, o que resulta em uma inibição da transcriptase reversa, como apontado em experimentos realizados também por HUMER *et al.*, (2008).

Com as populações celulares e sua confluência adequada, foram realizados testes para verificar o grau de citotoxicidade das células em meio controlado, e assim, determinar a melhor concentração de AZT para as culturas primárias, além do melhor tempo de pico de ação da droga. Foram realizados 576 testes, em placas semeadas, com concentrações variadas de AZT, com

respostas favoráveis as concentrações entre 500, 1000 e 1500 μM e exposição das culturas ao AZT no tempo de 1 de a 8 horas, 24 horas 48 horas e 72 horas e posteriormente chegando-se a fração ideal de 1000 μM , no tempo de 5 horas e 24 horas.

Para mensurar a atividade metabólica das células, a técnica de microtitulação colorimétrica *Methyl Thiazolyl Blue* (MTT) foi utilizada. Esta técnica consiste em uma das formas de se obter uma estimativa da viabilidade celular através da redução metabólica dos sais de tetrazolium (tetrazolina) para uma substância solúvel denominada formazana, técnica baseada no método descrito por HANSEN, NIELSEN, BERG (1989), com adaptações.

A caracterização das células, isto é, a identificação positiva para todas as células estudadas, como sendo melanoma, foi realizada com o auxílio da técnica de citometria de fluxo, sendo utilizados marcadores (anticorpos primários e secundários), resultados que corroboraram com a identificação previa realizada, que antecedeu as cirurgias dos pacientes.

Para análise da apoptose celular, foram utilizados marcadores para citometria (anexina) e o 7-AAD, um corante de viabilidade, que é utilizado como um indicador da integridade estrutural da membrana.

O 7-AAD liga-se ao material nuclear no interior da célula após o rompimento da membrana, o que lhe permite diferenciar as células em apoptose (anexina V-positivo) em estágios iniciais

(7-AAD negativo) e tardia (7-AAD-positivo), que, como o brometo de etídeo (BRE), se intercala entre as bases do DNA e tem a capacidade de fluorescer quando excitado pela luz ultravioleta.

Com essa análise foi possível determinar nos grupos estudados que não houve diferença entre os grupos controle 5 horas e tratado 5 horas, entretanto ocorreu um aumento da apoptose no grupo tratado 24 horas quando comparado com o controle 24 horas e essa diferença foi significativa. Esse resultado talvez esteja associado ao aumento exponencial e proliferativo das células em relação ao grupo de 5 horas ou a uma possível ação de ativação da p53 das células, que estavam silenciadas, levando a ativação da expressão proteica, seguida da recuperação do potencial proliferativo das células neoplásicas. O que corrobora com os achados por ASCHACHER *et al.* (2012), que em seus estudos, não verificaram aumento de apoptose em células tratadas somente com AZT, porém, com resultados estatisticamente significantes com a associação de AZT e outro retroviral, o didanosina (DDI).

A análise da proteína supressora de tumor P53 nas amostras estudadas não apresentou diferença estatisticamente significativa, quando comparadas ao grupo controle, no tempo de 5 horas e 24 horas. Porém, os dados plotados revelam uma alteração, visto que há um aumento da p53 das células tratadas grupo 5 horas, em relação ao grupo não tratado, o que sugere que de alguma maneira, o AZT ativou o gene P53, que transcreve a

proteína p53 (responsável pela checagem celular, que repara o dano ou induz a célula a apoptose), não acarretando um efeito generalizado na maquinaria celular, mas sim, um efeito pontual na p53.

Essas informações apontam para uma possível capacidade das células de contornarem o dano molecular, ou seja, a translocação de nucleotídeos rearranjados para a posição original, porém, como observado no gráfico de 24 horas, há uma posterior inversão e diminuição da p53, ocasionando uma relação direta entre o pico do efeito do AZT em 5 horas e a diminuição de seu efeito em 24 horas, tendo como consequência, o aumento das células neoplásicas, sugerindo com isso, o restabelecimento funcional das células. Estes dados estão de acordo com os achados descritos por ANDREOTTI *et al.*, (2011), que em seu trabalho com linhagens celulares em modelos experimentais utilizando animais, afirmam ser possível estabelecer que a reconstituição da atividade da p53 pode levar à morte de células tumorais e a regressão de tumores já estabelecidos.

Resultados encontrados por DATTA *et al.*, (2006), também corroboram com esses achados, que analisaram a ação do AZT em linfomas, de maneira prolongada, e seu encurtamento progressivo dos telômeros, constataram que há alteração na P14 (proteína envolvida no ciclo de regulação celular), que por sua vez, provoca a estabilização e reativação do gene P53, responsável pela transcrição da proteína p53, que suprime o tumor.

Estes resultados têm estimulado a ideia de desenvolver meios para ativar a função da p53 nas células neoplásicas, visto que a ativação da p53 é considerada como uma opção para terapias seletivas contra tumores, proporcionando um direcionamento para as células neoplásicas e poupando o tecido normal não afetado (OREN, 2003).

A análise da tradução da proteína (AUCG) telomerase das amostras, ou seja, quando as informações contidas em uma molécula de RNA mensageiro, são convertidas em proteínas, não apontou diferença estatisticamente significativa, embora apresente uma diminuição da porcentagem celular, quando comparados o grupo tratado 5 horas ao grupo controle 5 horas, situação inversa ao grupo 24 horas, visto existir uma tendência ao aumento, algo também verificado por SOUZA SOBRINHO *et al.* (2009) em células de linhagem.

A análise estatística da expressão gênica da telomerase, (decodificação da informação contida no DNA) apresentou uma diferença estatisticamente significativa, quando comparados os grupos controle 5 horas e tratados 5 horas. Ao analisarmos os grupos no tempo de 24 horas, é verificado um aumento exponencial do grupo tratado em relação a todos os outros grupos, sugerindo que após o efeito do AZT, as células não só recuperam-se como potencializam sua proliferação. Esses dados sugerem que o nucleosídeo do AZT interferiu em uma etapa anterior a tradução proteica, ou seja, no pareamento de bases (ATCG), como descrito na literatura por BROW *et al.* (2003),

PARSONS (2003), HUMER *et al.* (2008), GOMEZ *et al.* (2012), ASCHACHER *et al.* (2012) e SABOKROUCH *et al.* (2014). Porém, embora houvesse uma diminuição da expressão gênica, isso não foi o suficiente para causar um efeito em escala que comprometesse a tradução protéica, interferindo na expansão populacional das células estudadas.

É possível que existam mecanismos na maquinaria molecular do melanoma que contornem a diminuição da expressão gênica, com isso, mantendo o potencial proliferativo do melanoma, ou ainda que existam processos de resistência presentes no equilíbrio dinâmico do ciclo celular do melanoma não detectados que precisem de mais estudos para serem elucidados.

PERSPECTIVAS

Novos estudos relacionados à ativação da p53 em melanomas.

Mais estudos analisando o AZT como coadjuvante a outras drogas e a tratamentos quimioterápicos e radioterápicos.

Analisar as vias de sinalização de morte celular, no tempo de 5 e 24 horas, visto que existe um maior número de células em apoptose no grupo controle quando comparado ao grupo tratado.

Testes em camundongos com imunossupressão portadores da neoplasia inoculada, associados a cremes dérmicos como arcabouços ao AZT.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O AZT induziu a diminuição da expressão gênica da telomerase sem promover alteração na síntese dessa enzima em células de melanoma metastático humano.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Andreotti V, Ciribilli Y, Monti P, Bisio A, Lion M, Jordan J, et al. p53 transactivation and the impact of mutations, cofactors and small molecules using a simplified yeast-based screening system. *PLoS One*. 2011; 6 (6): 1-15.

Aschacher T, Sampl S, Kaser L, Bernhard D, Spittler A, Holzman K *et al.* The Combined Use of Known Antiviral Reverse Transcriptase Inhibitors AZT and DDI Induce Anticancer Effects at Low Concentrations. *Neoplasia*. 2012; 14:(1): 44-3.

Bar C, Blasco MA. Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases. *F1000 reserarch*.2016; 89:1-11.

Baren NV, Baurain JF, Coulie PG. Lymphoid neogenesis in melanoma. What does it tell us? *Oncoimmunol*. 2013; 2:(1), 1-2.

Blackburn EH, Strahl C. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol*. 1996; 16(1): 53-65.

Brown T, Sigurdson E, Rogatko A, Brocoli D. Telomerase inhibition using azidothymidine in the HT-29 colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol*. 2003; 10(8): 910-15.

Carvalho L, Lipay M, Belfort F, Santos IDAO, Andrade J, Haddad A, Brunstein F, Ferreira LM. Telomerase activity in prognostic histopathologic features of melanoma. *J. Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2006; 59(9): 961-8.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *The J Clin Invest.* 2005a; 115(4): 813-24.

Datta A, Bellon M, Datta US, Bazarbachi A, Lepelletier Y, Canioni D, Thomas *et al.* Persistent inhibition of telomerase reprograms adult Tcell leukemia to p53 dependent senescence. *Blood.* 2006; 108(3): 1021-9.

Fadri-Moskwik M, Zhou Q, Chai W. Beyond Telomerase: Telomere Instability as a Novel Target for Cancer Therapy. *J Mol Genet Med.* 2013; 7(4): 1-14.

Falchetti A, Franchi A, Bordi C, Mavilia C, Mais L, Cioppi F, Recenti *et.al.*, Azidothymidine induces apoptosis and inhibits cell growth and telomerase activity of human parathyroid cancer cells in culture. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(3):410-18.

Feron EJ, Veckeneer M, Ginderdeuren RPV, Lommel AV, Melles GRJ, Stalmans P. Trypan blue staining of epiretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol.* 2002; 120:141- 4.

Ferreira LMBM, Gomes EF, Silva EF, Silvia MSB, Araújo RP, Sales A. Metástase tonsilar de melanoma maligno. Rev Bras Otorrinolaringol. 2006; 72: (6)851.

Figueiredo LC, Cordeiro LN, Arruda AP, Carvalho MDF, Ribeiro EM, Coutinho HDN. Câncer de pele: Estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. Rev Bras Cancerologia. 2003; 49(3): 179-83.

Flach EH, Rebecca VW, Herlyn M, Smalley KSM, Anderson ARA. Fibroblasts contribute to melanoma tumour growth and drug resistance. Mol Pharm. 2011;8(6):2039-49.

Fox MC, Lao CD, Schwartz JL, Frohm ML, Bichakjian CK, Johnson TM. Management options for metastatic melanoma in the era of novel therapies: A primer for the practicing dermatologist: Part I: Management of stage III disease. J Am Acad of Dermatol. 2013; 68(1):1 e 1-9.

Gandini S, Montella M, Ayala F, Benedetto L, Rossi CR, Vecchiato A, *et al.* Sun exposure and melanoma prognostic factors. Oncol Lett. 2016; 11(4): 2706–14.

Gerner RE, Kitamura H, Moore GE. Studies of tumor cells lines derived from patients with malignant melanoma. Oncology. 1975; 31: 31-43.

Gomez DA, Armando RG, Alonso DF. AZT as telomerase inhibitor. *Font Oncol.* 2012; 2(113): 1-5.

Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, Shoshana G, Eaton YE, Roderick AK, *et al.* Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Medicine.* 1999; 5(10): 1164-0.

Han D, Thomas DC, Zager JS, Pockaj B, White RL, Leong SPL. Clinical utilities and biological characteristics of melanoma sentinel lymph nodes. *World J Clin Oncol.* 2016; 7(2): 174-188.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 1989; 119(2):203-10.

Hayflick L. The cell biology of aging. *J Invest Dermatol.* 1979; 73(1):8-14.

Humer J, Ferko B, Waltenberg, Rapberger R, Pehamberger H, Muster T. Azidothymidine inhibits melanoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Melanoma Res.* 2008; 18(5): 314-21.

Jafri MA, Ansari SA, Algahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.* 2016; 8: 1-18.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994; 266:2011-5.

Lima JM, Serafim PVP, Silva IDCG, Forones NM. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Gastroenterol*. 2006; 43(1): 8-13.

Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Fichou MPT, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acid Res*. 2002. 30(4): 839-65.

Mo Y, Gan Y, Song S, Johnston X, Wientjes MG, Jessie LS. Simultaneous targeting of telomeres and telomerase as cancer therapeutic approach. *Câncer Res*. 2003; 63:579-85.

Moskwick M, Zhou Q, Chai W. Beyond Telomerase: Telomere Instability as a Novel Target for Cancer Therapy. *J Mol Genet Med*. 2013;7(4): 1-14.

Nam KW, Bae YC, Nam SB, Kim JH, Kim HS, Choi YJ. Characteristics and Treatment of Cutaneous Melanoma of the Foot Arch *Plast Surg*. 2016; 43(1): 59-65.

Niezgoda A, Niezgoda P, Czajkowski R. Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy. *BioMed Research Int*. 2015; 1-16.

Oliveira AF, Gragnani A, Oliveira Filho RS, Santos IDAO, França SG, Enokihara MMSS, Ferreira LM. Modelo experimental de cultura primária de melanoma metastático por punção aspirativa de agulha fina. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(5): 390-03.

Oliveira Filho RS, Paiva GR, Ferreira LM, Alves MCA, Santos IDAO, Enokihara MMSS. Linfonodo sentinela em melanoma em criança: Relato de caso. *J Pediatr.* 2002; 78(5): 429-32.

Oren, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation.* 2003; 10 (4): 431-42.

Parreiras FC, Wainstem AJA, Morete M, Geo LS. Prevalência de dor em pacientes com melanoma. *Rev Dor. São Paulo.* 2016.17(1): 39-2.

Parsons HA. Telômeros, telomerase e câncer. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba.* 2003; 5(1): 54-9.

Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, Hiyama K, Hiyama E, Wright WE, Shay JW. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Methods in Cell Science.* 1995; 17: 1-15.

Ramirez RD, Wright E, Shay JW, Taylor RS. Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol.* 1997; 108: 113-17.

Santos IDAO, Brunstein F, Minami E, Carvalho C, Filho EFA, Ferreira LM. Neoplasias malignas de pele: Análise epidemiológica de 1.242 pacientes operados. JBM 1996; 71(2): 61-63.

Sharpless EN & Depinho RA. Telomeres stem cells, senescence, and cancer. J Clin Invest. 2004; 113(2): 160-68.

Sober AJ, Kho HK. Melanoma e outras lesões cutâneas pigmentadas. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. (Ed). Harrison: Medicina Interna. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1995; 1958-62.

Souza Sobrinho CP, Gragnani A, Santos IDAO, Oliveira AF, Garcia JE, Ferreira LM. Melanoma Cutâneo e Telomerase. Applied Cancer Research. 2009; 29(2): 1-18.

Souza Sobrinho CP, Gragnani A, Santos IDAO, Oliveira AF, Lipay MVN, Ferreira LM. AZT na atividade da telomerase e na proliferação de células de melanoma HS 839.T. Acta Ciru Bras. 2012; 27(12): 855-60.

Taylor RS, Ramirez RD, Ogoshi M, Chaffins M, Piatyszek MA, Shay JW. Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin condition. J Invest Dermatol. 1996; 106(4): 759-65.

Tucci-Viegas, Hochman B, França JP, Ferreira LM. Keloid explant culture: a model for keloid fibroblasts isolation and cultivation based on the biological differences of its specific regions. *Int Wound J.* 2010; 7(5):339-48.

Uehara, H, Nardone, G, Nazarenko IA, Hohman, RJ. Detection of telomerase activity utilizing energy transfer primers: comparison with gel- and ELISA-based detection. *Biotechniques.* 1999; 26 (3):552-58.

Umemoto T, Yamato M, Nishida K, Yang J, Tano Y, Okano T. Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state. *Stem Cell.* 2006; 24:86-94.

Vazquez VL, Silva TB, Vieira MA, Oliveira ATT, Lisboa MV, Andrade DAP, *et al.*, Melanoma characteristics in Brazil: demographics, treatment, and survival analysis. *BMC Res Notes.* 2015; 8: 4.

Vozza A, Borriello A, Criniti V, Vozza G, Ragineà FD. New established melanoma cell lines: Genetic and biochemical characterization of cell division cycle. *J. Eur Acad of Dermatol and Venereol.* 2003; 17(1): 37–41.

Waghorn PA, Jackson MR, Gouverneur V, Vallis KA. Targeting telomerase with radiolabeled inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2017; 125:117-29.

Zaccagnini G, Gaetano C, Pietra L, Nanni S, Grasselli A, Mangoni A, et al. Telomerase mediates vascular endothelial growth factor-dependent responsiveness in a rat model of hind limb ischemia. *J Biol Chem.* 2005; 280(15):14790-98.

Zhang F, Cheng D, Wang S, Zhu J. Human Specific Regulation of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene. *Genes Basel.* 2016; 28 (7): 1-7.

NORMAS ADOTADAS

9. NORMAS ADOTADAS

- ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.

- Ministério da Saúde - Conselho Nacional de Saúde - Resolução no. 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília – D.F.; 1996.24p.

- Consulta ao DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> –terminologia em saúde.

- Goldenberg S. Orientação Normativa para Elaboração e Difusão de Trabalhos Científicos. São Paulo: 2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org>.

- Lydia Masako Ferreira. Projetos, Dissertações e Teses- Orientações Normativas. Guia Prático. 2017.

ABSTRACT

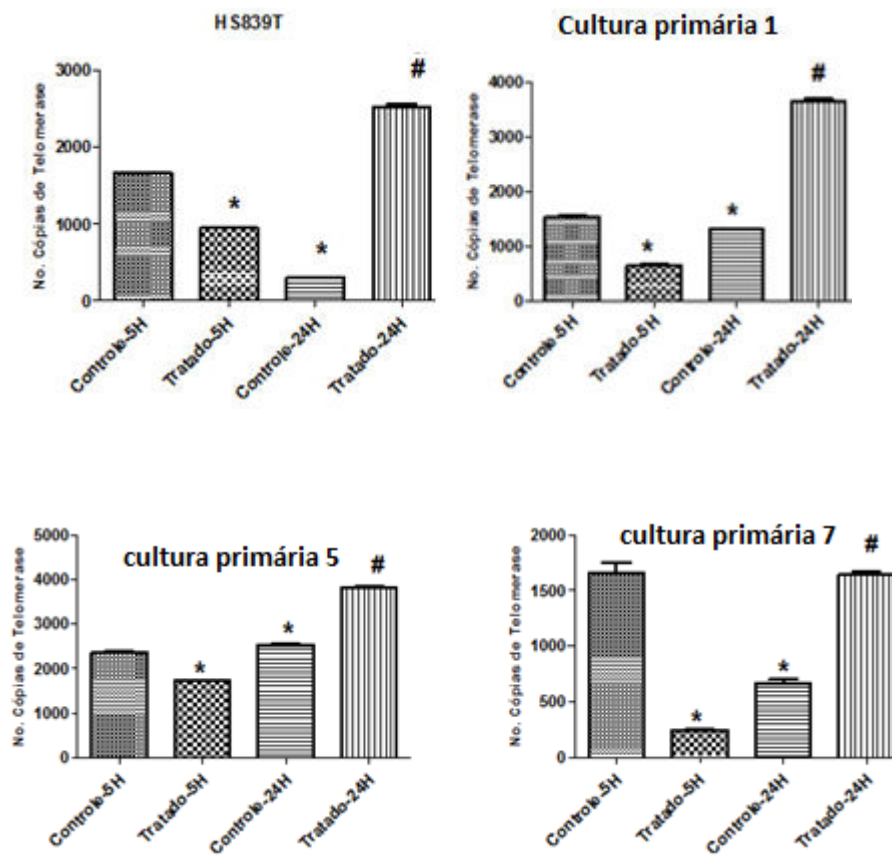
10.ABSTRACT

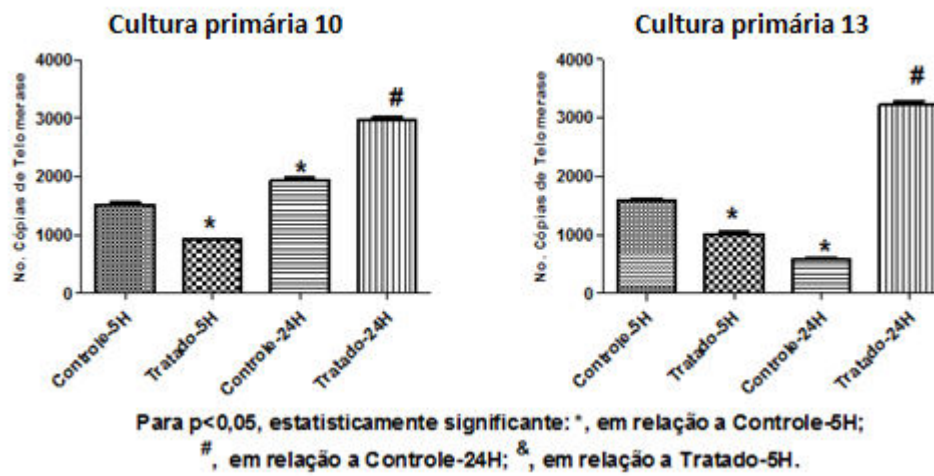
Introduction: Melanoma is an aggressive, fast-growing cutaneous melanocytic neoplasm. Several factors contribute to its emergence, such as genetic predisposition, sun exposure, physical trauma in existing nevi, and immunodeficiencies. Evidence demonstrates that, in both melanoma and other neoplasms, the malignant transformation process involves several genetic alterations which modify important cellular processes including proliferation, differentiation, and programmed cell death, which are also associated with telomere shortening. Telomerase is a specialized reverse transcriptase which is responsible for the synthesis of telomeres, and it may be associated with cellular immortalization and cancer. Its activity is tightly repressed in the vast majority of normal human somatic cells, but it is present in almost all immortalized, germ, and stem cell lines, as well as in approximately 90% of human tumors. The finite capacity of cellular replication is overcome by immortalized cells, which reactivate telomerase. This suggests that the progression of malignant diseases may be dependent on telomerase reactivation, and that a telomerase-inhibiting agent, such as zidovudine (AZT), could present as an effective antitumor drug. **Purpose:** To evaluate action of AZT on gene expression and protein synthesis on telomerase in cells of metastatic melanoma. **Methods:** Patient cells and Hs839T melanoma cell lines were used in this work. Patient cells were obtained in a surgical center of Hospital São Paulo from tissue samples collected from the thoracic and plantar regions, axillary lymph nodes, and inguinal lymph nodes. Cells were cultivated in cell culture medium supplemented with 1000 μ M AZT, for 5h and 24h, always in triplicates, as well as in non-supplemented medium (control groups). AZT effects were analyzed in comparison with the non-treated control groups. Measurement of cell proliferation was carried out using the MTT assay. Cell characterization, p53 labeling, apoptotic cell labelling, and telomerase detection (protein synthesis) were performed by flow cytometry. Telomerase gene amplification was performed by RT-PCR. **Results:** Cells treated with AZT presented a statistically significant decrease in telomerase gene expression, whereas no decrease was observed in telomerase protein synthesis. **Conclusion:** AZT caused a decrease in telomerase gene expression without promoting alteration in the synthesis of this enzyme in human metastatic melanoma cells.

APÊNDICES

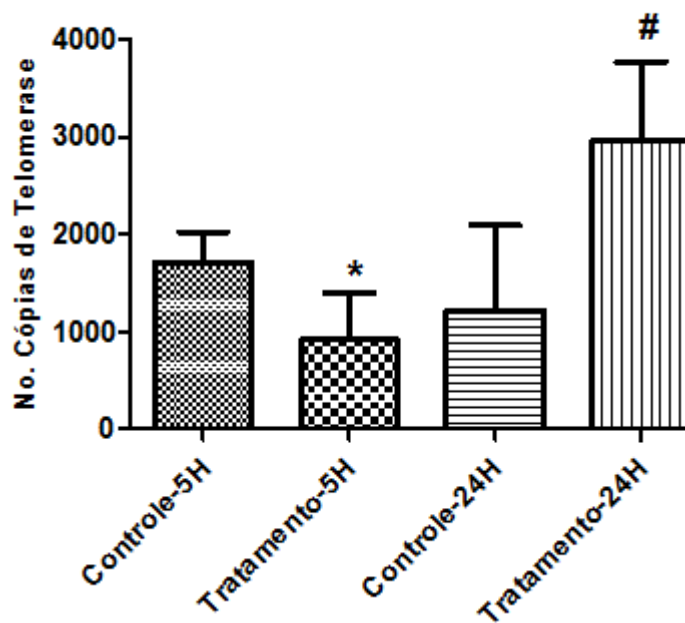
11.APÊNDICES

Perfil de similaridade entre as culturas de células primárias e de linhagem.





Média cultura de células primárias e Hs839T



	Número de Cópulas de Telomerase					
	ATCC	PAC1	PAC5*	PAC7	PAC10	PAC13
C	1656	1546	2348	1656	1520	1596
C1000	940	661	1713	243	919	1016
24H	293	1308	6065	669	1930	590
24H-1000	2516	3637	802*	1647	2965	3228

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1 – Título do projeto: **AZT NA ATIVIDADE DA TELOMERASE, EXPRESSÃO DE P53 E APOPTOSE EM MELANOMA METASTÁTICO; ou seja, UTILIZAÇÃO DE UM MEDICAMENTO CHAMADO AZT, QUE NORMALMENTE É USADO NO TRATAMENTO DE PACIENTES QUE TEM AIDS PARA DIMINUIR O NÚMERO DE VÍRUS, E AGE CONTRA UMA PROTEÍNA QUE É UMA SUBSTÂNCIA ABUNDANTE DENTRO DAS CÉLULAS DO CORPO HUMANO CHAMADA TELOMERASE, QUE ESTÁ RELACIONADA COM O MELANOMA, QUE É UM TIPO DE CÂNCER MALIGNO DA PELE, QUE SERÁ COLETADO ATRAVÉS DE ASPIRAÇÃO DE AMOSTRAS DO TECIDO DESCARTADO NA OPERAÇÃO CIRÚRGICA, ATRAVÉS DO USO DE SERINGA COM AGULHA FINA.**

2 – Desenho do estudo: experimental *in vitro*; ou seja, testes controlados que copiam de uma maneira muito próxima o meio ambiente e às condições de um corpo normal onde às células sobrevivem, com equipamentos apropriados que tem como objetivo nesse trabalho o de estudar a atividade da telomerase, que se trata de uma proteína, uma das substâncias mais abundantes no corpo, produzidas dentro das células, e acreditamos que ela possa ter um importante papel relacionado a diversos tipos de câncer no homem, inclusive o melanoma, um tipo de câncer de pele.

Estamos realizando estudos para analisar os efeitos de um medicamento chamado AZT, droga essa normalmente usada no auxílio para pessoas portadoras do vírus HIV (AIDS).

Estudos indicam que esse medicamento (AZT) pode ajudar no tratamento contra essa doença e contribuir no auxílio diagnóstico do melanoma maligno; “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa obter informações e dados fundamentais para o e melhor conhecimento do tumor, podendo,

futuramente, auxiliar na cura dos pacientes portadores de melanoma maligno”.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: O seu ato operatório transcorrerá normalmente, sem nenhuma alteração, sem nenhum prejuízo físico, moral ou psíquico; somente será captado o fragmento que for retirado durante a cirurgia e que seria desprezada, para ser enviada ao laboratório de cultura de células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

4 – Não existem desconfortos e riscos ao paciente.

5 – Não há benefício direto para o participante.

6 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Celestino Próspero de Souza que pode ser encontrado no endereço **Rua Pedro de Toledo, 781 – 11 andar, frente** Telefone (5579.2583). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br

7 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

8 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

9 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

10 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **AZT NA ATIVIDADE DA TELOMERASE, EXPRESSÃO DE P53 E APOPTOSE EM MELANOMA METASTÁTICO**. Eu discuti com Celestino Próspero de Souza sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

-

----- Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXOS



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 21 de fevereiro de 2013

CEP Nº **1533/07**

CONEP Nº:

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): CELESTINO PRÓSPERO DE SOUZA SOBRINHO

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia

Título do estudo: AZT atividade da telomerase e viabilidade in vitro de células metastáticas de melanoma por punção aspirativa

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU E APROVOU o(a) Emenda ao projeto (versão 1 de 05/fev/2013, incorporando as seguintes alterações: 1) alteração do título, de "AZT atividade da telomerase e viabilidade in vitro de células metastáticas de melanoma por punção aspirativa", para: "AZT na atividade da telomerase, expressão de P53 e apoptose em melanoma metastático através da técnica de punção aspirativa por agulha fina"; 2) alteração dos orientadores, sendo orientadora: LYDIA MASAKO FERREIRA, e co-orientadores: IVAN DUNSHEE DE ABRANCHES OLIVEIRA SANTOS e SILVANA GAIBA DE FRANÇA; 3) nova metodologia) do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

FONTES CONSULTADAS

Caprioglio, D. (2008). "Fluorescence in Biology." Retrieved 26 June 2008, from <http://csm.colostate.edu/biology/dcaprio/412L/Fluor1.html>.

Ministério da Saúde . Instituto Nacional do Câncer-INCA.

Incidência nacional de câncer no Brasil: Estimativa 2016.

Ministério da Saúde - Secretaria de Atenção a Saúde. 2016.

TRAPEZE® RT Telomerase Detection Kit (Catalog No. S7710)
(Chemical International).