

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Embriologia e Genética
Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual

Matheus Reck Dutra

**Avaliação do efeito de EGF e FGF2 na melanogênese e proliferação de
células de melanoma murino B16F10**

Florianópolis

2017

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Embriologia e Genética
Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual

Matheus Reck Dutra

Avaliação do efeito de EGF e FGF2 na melanogênese e proliferação de células de melanoma murino B16F10

Projeto de trabalho de conclusão de curso (BIO 7013) do currículo do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador: Andrea Gonçalves Trentin. Coorientador: Bianca Luise Teixeira

Florianópolis

2017

Matheus Reck Dutra

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE EGF E FGF2 NA MELANOGÊNESE E
PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10**

Esta monografia foi julgada adequada para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovada em sua forma final pelo curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 11 de dezembro de 2017.

Prof^o. Dr^o. Carlos Roberto Zanetti

Coordenador do Curso de Ciências Biológicas

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a Andrea Gonçalves Trentin
Orientadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^o. Dr^o. Ricardo Castilho Garcez
Universidade Federal de Santa Catarina

M.e. Diana Heck

Universidade Federal de Santa Catarina

M.e. Michele Rode

Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Andrea Trentin por despertar minha atenção nas suas aulas de Células-Tronco, mais uma vez nas aulas de microvesículas e por ter me acolhido no LACERT.

Aos professores Giordano por despertar minha curiosidade em Biologia Celular e Ricardo por me instigar com a complexidade das vias moleculares.

À minha coorientadora Bianca que foi fundamental para que este trabalho fosse desenvolvido, tendo enorme paciência para me conduzir.

A Rafaela, minha primeira coorientadora, me inspirando como exemplo. À Priscila, Diego e Diana com a atenção me auxiliando com todas as minhas dúvidas e aos demais amigos que o LACERT me deu nesses anos, fazendo eu me sentir em casa.

À minha família que sempre me proporcionou liberdade de pensamento e me incentivam em todos os momentos.

À UFSC e a Universidade de Adelaide essenciais para a minha formação, me mostrando que a criatividade é o fator mais importante para se fazer ciência.

Finalmente ao LACERT ambiente por onde passam, crescem e se especificam pessoas com um mesmo objetivo, se influenciando ao longo do caminho. Local onde foi proporcionado o meio para que eu pudesse me diferenciar e encontrar uma via a ser seguida.

RESUMO

DUTRA, Matheus Reck. **Avaliação do efeito de EGF e FGF2 na melanogênese e proliferação de melanoma murino B16F10**. Florianópolis, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2017.

O câncer é caracterizado como um conjunto de doenças que apresentam crescimento celular desordenado podendo originar metástase. Um dos tipos mais agressivos de câncer é o melanoma que se desenvolve a partir de mutações genéticas causadas por fatores externos, como ambiente, hábitos e interações sociais, alterando o metabolismo de melanócitos. Os melanócitos são células produtoras de melanina, originadas da crista neural, uma estrutura tecidual que se forma durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados. Os precursores de melanócitos expressam o fator de transcrição *Mitf*, considerado o principal regulador da melanogênese. Neste contexto, dados obtidos por nosso laboratório mostram que o fator de crescimento EGF influencia na diferenciação de melanócitos da crista neural e o fator de crescimento FGF2 está envolvido na renovação de progenitores multipotentes da crista neural e na diminuição de *FoxD3*, um fator de transcrição repressor de *Mitf*. Dessa forma, nesse trabalho, os fatores EGF e FGF2 foram estudados em melanoma, tumor derivado das células da crista neural, para compreender a melanogênese e averiguar se estão relacionados com a proliferação celular dessa linhagem. Para isso, a linhagem B16F10 foi utilizada, assim como tratamentos por diferentes tempos de EGF (0,01µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL e 10 µg/mL) e FGF2 (10ng/mL). Foram realizados os testes de proliferação celular por MTS, análise qualitativa e quantitativa da melanogênese, imunofluorescência para *Mitf* e quantificação da expressão de *Mitf* através de *Western blotting*. Os resultados obtidos mostraram que não houve influência estatisticamente significativa de EGF e FGF2 na melanogênese e na proliferação das células de melanoma murino B16F10. Foi observado também que todas as células B16F10 expressam o fator de transcrição *Mitf*, porém não foi possível quantificar sua expressão, devido a problemas metodológicos. Os resultados obtidos com EGF e FGF2 em melanoma B16F10 foram comparados com os obtidos em crista neural em nosso laboratório, como conclusão pode ser observado que EGF e FGF2 não exercem a mesma função na proliferação e melanogênese de melanoma que no desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Melanina. Câncer. Mutação. Diferenciação. Crista Neural.

ABSTRACT

DUTRA, Matheus Reck. **Evaluation of EGF and FGF2 on melanogenesis and proliferation of murine melanoma B16F10.** Florianópolis, 2017. Final Degree Essay. Degree of Biological Science, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2017.

Cancer is a series of diseases that shows disorderly cellular growth, being able to originate metastasis. Melanoma is one of most aggressive cancer, which develops according to genetic mutations caused by external factors, as environment, habits and social interaction, altering the melanocytes metabolism. Melanocytes are cells that produce melanin, originated from neural crest, a tissue structure formed during the vertebrate embryo development. The melanocyte precursors express the transcription factor Mitf, considered to be the main melanogenesis regulator. In this context, our laboratory data show that the growth factor EGF influences on neural crest melanocyte differentiation while the growth factor FGF2 induces neural crest multipotent progenitor renewal and FoxD3 decrease, a transcription factor repressor of Mitf. On this essay, the growth factors EGF and FGF2 were studied in melanoma, tumor derived from neural crest cells, to understand the melanogenesis and ascertain if they are related to cellular proliferation on this lineage. For that, the lineage B16F10 was used, treated in different times with EGF (0,01µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL and 10 µg/mL) and FGF2 (10ng/mL). It was executed a proliferation test by MTS, qualitative and quantitative analysis of melanogenesis, Mitf immunofluorescence, and Mitf quantification through Western Blotting. The results revealed that EGF and FGF2 do not present statistical influence on melanogenesis and on cellular proliferation of murine melanoma B16F10. It was also revealed that all B16F10 cells express the transcription factor Mitf, however it was not possible to quantify its expression due to methodological problems. The obtained results with EGF and FGF2 in B16F10 melanoma were compared with neural crest results from our laboratory. As a conclusion, EGF and FGF2 have not shown the same proliferation and melanogenesis function in melanoma and in embryo development.

Key words: Melanin. Cancer. Mutation. Differentiation. Neural Crest

SUMÁRIO

1	Introdução	7
1.1	Câncer	7
1.2	Melanoma	7
1.3	Progressão do melanoma	9
1.4	Melanogênese.....	10
1.5	Abordagens terapêuticas para melanoma	12
1.6	Fatores de crescimento.....	14
1.6.1	EGF	14
1.6.2	FGF2.....	14
2	Justificativa.....	16
3	Objetivos	17
3.1	Objetivo geral	17
3.2	Objetivos específicos	17
4.	Materiais e métodos	18
4.1	Cultura Celular	18
4.2	Ensaio de proliferação celular por MTS	18
4.3	Análise de melanogênese	19
4.4	Análise de Mitf por imunocitoquímica.....	19
4.5	Quantificação de proteínas por <i>Western Blotting</i>	20
5	Resultados	22
5.1	Deteção da proteína Mitf em células B16F10	22
5.2	Ensaio de viabilidade celular.....	23
5.3	EGF e FGF2 não alteram a produção de melanina	25
5.3.1	Análise qualitativa	25
5.3.2	Análise quantitativa.....	26
5.4	Quantificação de Mitf por <i>Western blotting</i>	27
6	Discussão.....	29
7	Conclusões.....	32
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 Introdução

1.1 Câncer

O câncer é caracterizado como um conjunto de doenças de crescimento celular desordenado, que perdem a capacidade de inibição por contato se espalhando pelo tecido, podendo invadir outros tecidos, processo conhecido como metástase (Instituto Nacional de Câncer – INCA 2017).

O câncer ocorre quando as células acumulam mutações genéticas causadas por fatores internos, ligados à herança genética do indivíduo, ou fatores externos, como meio ambiente, hábitos e interações sociais. Fatores externos como cigarro, exposição ao sol, certos vírus, alcoolismo e medicamentos são alguns dos fatores que podem levar ao desenvolvimento do câncer (Instituto Nacional de Câncer – INCA 2017). Alguns genes estão diretamente relacionados ao aparecimento do câncer, os oncogenes e os genes supressores de tumor. Os proto-oncogenes atuam na proliferação celular, quando sofrem alguma mutação ou amplificação e passam a ativar sua via de sinalização constitutivamente, gerando um ciclo celular irregular, passando a atuar como oncogenes (American Cancer Society, 2017).

Já os genes supressores de tumor atuam no controle do ciclo celular, no reparo de erros no DNA, e que podem estimular a apoptose. Quando uma mutação inativa esses genes a célula pode perder o controle do seu ciclo celular e passar a proliferar descontroladamente (American Cancer Society, 2017).

1.2 Melanoma

O melanoma é um tumor maligno originário dos melanócitos da pele, células especializadas na produção do pigmento melanina (National Cancer Institute, 2017).

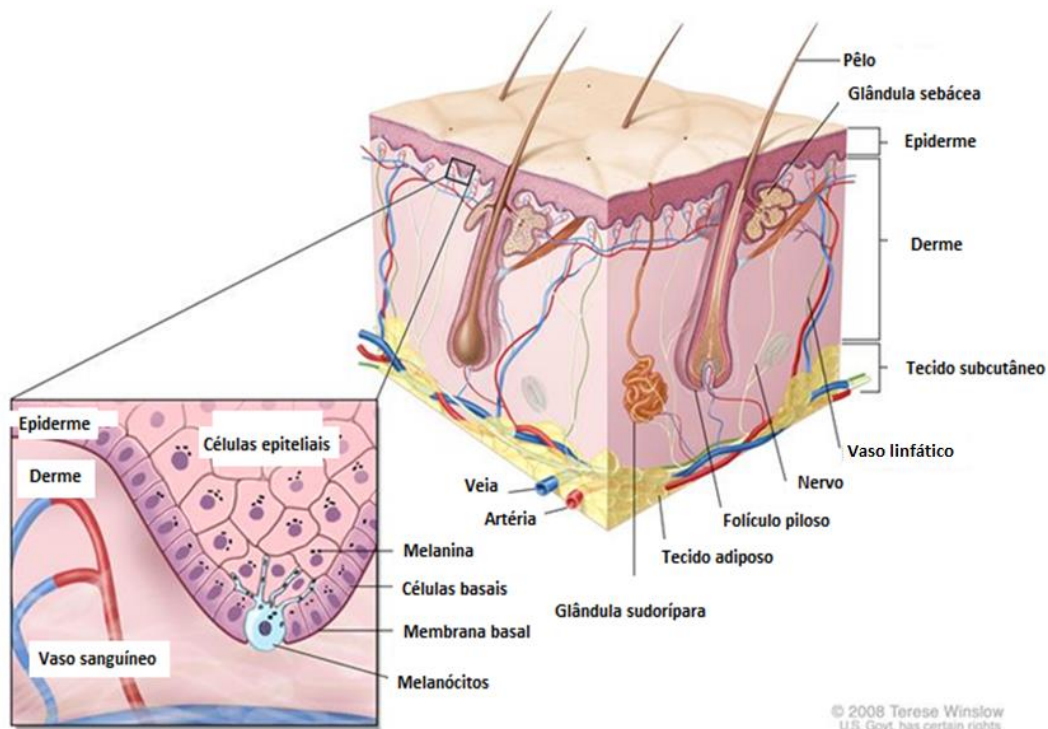
Diversos fatores de risco estão associados ao surgimento do melanoma, como herança genética, características pigmentares da pele, exposição ao sol, imunossupressão e outros fatores ambientais (National Cancer Institute, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer - INCA (2017), no Brasil, a estimativa de novos casos de melanoma em 2016 foi de 5.670, sendo 2.670 mulheres e 3.000 homens. Representando apenas 3% das neoplasias malignas, porém o número de mortes em 2013 foi de 1.547, 644 mulheres e 903 homens.

De acordo com Matheus e Verri (2015), a partir de 40 anos de idade a neoplasia se torna mais comum. Essa patologia possui distribuição igualitária em ambos os sexos, e é encontrada em diversas etnias, com mais prevalência em caucasianos. Entretanto, a distribuição ocorre de forma diferente, nas mulheres sendo mais frequente nos membros inferiores e nos homens no tronco.

De acordo com o *National Cancer Institute (2017)* o melanoma se origina a partir dos melanócitos presentes na camada basal da epiderme, abaixo da camada estratificada de queratinócitos, na transição da derme para a epiderme (figura 1).

Figura 1 - Esquema das camadas da pele e produção de melanina



Adaptado de Terese Winslow NCI, 2008.

Nota: Ilustração exemplificando as três camadas da pele - Epiderme, Derme e Tecido Subcutâneo. O local dos melanócitos, a produção de melanina e sua distribuição para as células epiteliais.

1.3 Progressão do melanoma

O câncer de pele representa mais da metade dos casos de câncer diagnosticados no Brasil, correspondendo a 30% dos casos malignos. O melanoma, um dos tipos de câncer de pele, representa apenas 3% dos tumores malignos, entretanto, é o que apresenta maior risco devido à alta taxa de metástase, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer - INCA (2017). Sendo assim o melanoma um dos tipos de câncer de pele de menor ocorrência, porém, de maior letalidade.

O aparecimento tumoral pode ocorrer a partir de uma mutação em um oncogene que induz a formação de um neoplasma benigno. Este neoplasma

começa a proliferar de forma mais rápida podendo acumular mais mutações em outros genes supressores de tumor, levando a um estado ainda mais proliferativo (Shain *et al.* 2015). A progressão do melanoma é caracterizada clinicamente e histologicamente em seis diferentes etapas: (1) nevo melanocítico, (2) nevo melanocítico com hiperplasia lentiginosa e diferenciação aberrante, (3) nevo melanocítico com hiperplasia lentiginosa persistente e diferenciação aberrante com atipia nuclear melanocítica, (4) melanoma de crescimento radial (5) melanoma com crescimento vertiginoso, com capacidade de metástase e (6) melanoma metastático (Clark *et al.*, 1984).

1.4 Melanogênese

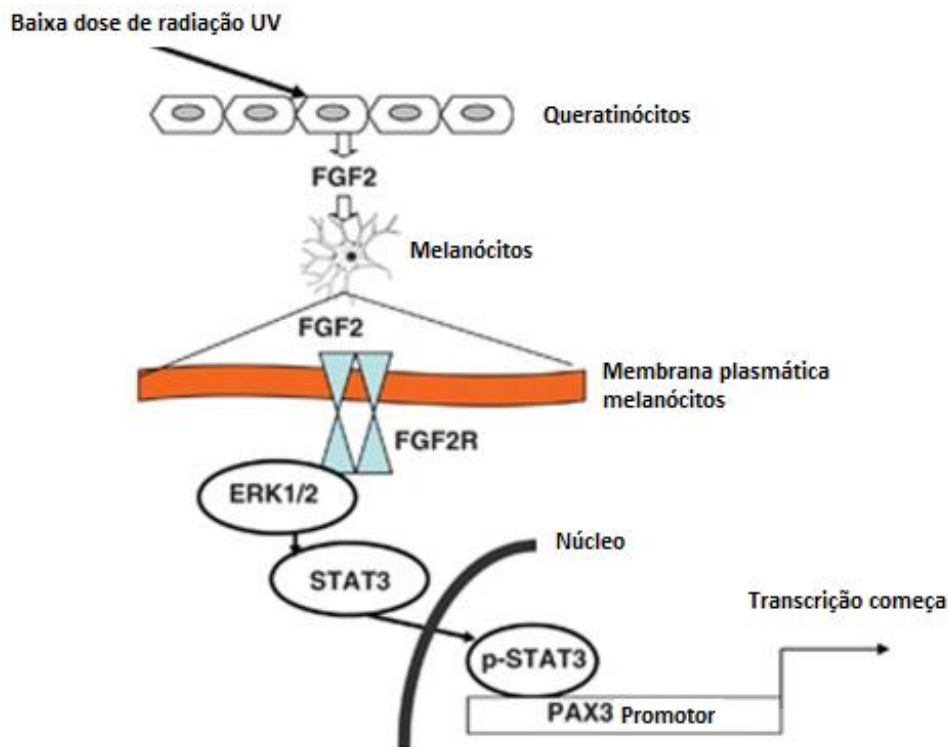
Os melanócitos são células originadas, em sua maioria, a partir das células da crista neural, uma estrutura embrionária que se forma durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados, no processo de neurulação. Os progenitores melanocíticos se desprendem do tubo neural e migram, começando a expressar o fator de transcrição Mitf até chegarem ao seu destino final (Thomas e Erickson, 2008). Mitf é um fator de transcrição tido como o principal regulador da melanogênese, atuando na transcrição dos genes tirosinase, Trp-1 e Trp-2, principais enzimas envolvidas na síntese de melanina. Os melanoblastos, células indiferenciadas, que migram até a epiderme dão origem aos melanócitos da pele (Thomas e Erickson, 2008).

Os melanócitos iniciam a produção de melanina em organelas especializadas, os melanosomos, sendo esse processo iniciado a partir da tirosina e envolvendo as enzimas tirosinase-1 (Trp1) e dopacromo tautomerase (Trp2) (Slominski *et al.*, 2004). Segundo Fajuyigbe (2016), estudos epidemiológicos mostram que a melanina constitutiva possui uma alta eficiência na prevenção de câncer, prevenindo o DNA de sofrer dano pela radiação ultravioleta. Entretanto, estudos experimentais mostram apenas uma proteção modesta da melanina contra lesões no DNA causadas por radiação. Isto pode ser explicado, pois diversos estudos se baseiam no método Dose Mínima de Eritema, onde o modelo de pele é exposto a uma radiação e ao aparecer vermelhidão se considera que houve um dano a pele. Porém, este

método é questionado por não ser possível comparar uma pele clara com uma pele que possui muita melanina, pois a pele com mais melanina acaba sendo exposta a uma maior radiação para apresentar vermelhidão. Outro fator que traz complicações é a quantidade e o comprimento de onda utilizada nos estudos de forma diferente.

Diversos fatores externos podem regular epigeneticamente os melanócitos e aumentar a produção de melanina, como a radiação ultravioleta (UV), além de fatores de crescimento, como endotelina-3 e o fator de crescimento hepático (HGF), hormônio alfa estimulador de melanócitos (α MSH), e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (Hirobe, 2011; Sato, 2008). De acordo com Dong e colaboradores (2011) queratinócitos, ao serem expostos a radiação UVB, secretam FGF2 que atua de forma parácrina aumentando a proliferação de melanócitos e conseqüentemente a quantidade de melanina. FGF2 possui um efeito dose dependente sobre Pax3, que por sua vez é um fator de transcrição promotor de Mitf (figura 2).

Figura 2 - Esquema da influência de FGF2 na estimulação de Pax3



Adaptado de Dong *et al.*, 2011.

Nota: A figura representa a estimulação dos queratinócitos através de uma dose de radiação UV. Deste modo os queratinócitos produzem FGF2, que estimula seu receptor de membrana, e através da via ERK aciona STAT3 para atuar na transcrição de Pax3.

1.5 Abordagens terapêuticas para melanoma

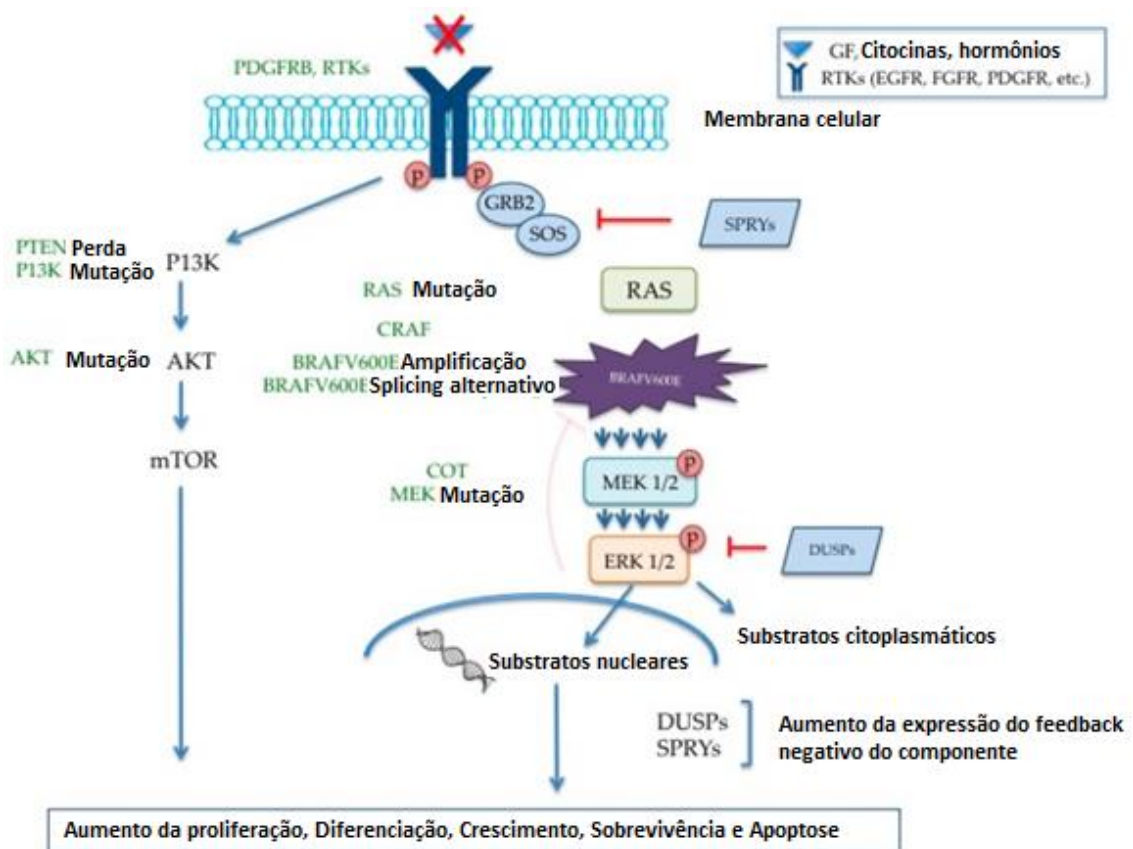
Segundo Ibrahim e Haluska (2009), a proteína mutada B-RAF é identificada na maioria dos melanomas, sendo importantes na via de sinalização RAF/MEK/ERK que leva a proliferação celular. A mutação na molécula de sinalização BRAF leva um aumento da fosforilação e consequentemente de ERK ativando a via de sinalização para proliferação. Essa mutação ocorre em 66% dos melanomas malignos, sendo B-RAF um alvo terapêutico muito visado (Wan *et al.*, 2004; Ibrahim and Haluska, 2009).

Neste contexto, foram desenvolvidos compostos químicos que se ligam ao sítio ativo de B-RAF inibindo a sua ativação. O primeiro composto químico a ser aprovado para bloquear B-RAF mutado foi o Vemurafenib (Bollag *et al.*, 2012). Esse inibidor, ao ser usado no tratamento de melanomas, obtém

resultados significativos na redução do tumor durante um período curto após sua aplicação, porém, as células podem desenvolver resistência ao Vemurafenib, resultando em uma reincidência do tumor (Wagle *et al.*, 2011). A via de PI3K-AKT-mTOR se torna hiperativada devido à regulação epigenética (Chan *et al.*, 2017).

O EGFR pode estar superexpresso em algumas células resistentes a inibidores de B-RAF, o que leva o melanoma a continuar a proliferação independente do uso de Vemurafenib (Girotti *et al.*, 2012). Assim a inibição concomitante de EGF teria que ser empregada no tratamento de alguns melanomas (figura 3).

Figura 3 - Via de sinalização com B-RAF mutado



Adaptado de Obaid *et al.*, 2017.

Nota: Via de sinalização de melanócito que sofreu mutação em B-RAF. Em células normais um fator de crescimento ativa a via de sinalização para crescimento passando pela proteína BRAF que precisa ser fosforilado por RAS para continuar a ativação das proteínas subsequentes, porém, quando BRAF está mutado pode sofrer autofosforilação.

1.6 Fatores de crescimento

1.6.1 EGF

EGF (Fator de crescimento epidermal) é um polipeptídeo constituído de 53 aminoácidos que se liga ao receptor EGFR, um dos 4 receptores da família erbB (receptores tirosina kinase). A ligação ao seu receptor leva à ativação das vias de proliferação, migração e sobrevivência, dependendo da especificidade celular (Steins *et al.*, 2010).

Dados prévios do laboratório mostraram que o EGF promove um aumento na diferenciação de progenitores da crista neural para melanócitos, estimulando a proliferação de células Mitf-positivas (dados não publicados). Segundo Teixeira (2011) células da crista neural truncal ao migrarem expressam receptores de EGF. Em outro experimento células da crista neural quando tratadas com EGF diminuíam a expressão de FoxD3 (dados não publicados), um importante inibidor de Mitf (Sommer, 2011). Concomitantemente, de acordo com Bracher (2013), EGF pode atuar na metástase de melanoma, ao observar que células *knock down* para EGF diminuem sua migração. Em outro experimento, Boone (2011) observou uma associação entre a expressão de EGFR e metástases bem como um aumento na espessura do tumor relacionado à polissomia de EGFR.

Girotti e colaboradores (2012) utilizando linhagens resistentes a inibidores de B-RAF observam um aumento de receptores de EGF, e ao utilizar inibidores de EGFR e B-RAF, concomitantemente, houve uma redução no crescimento do tumor.

1.6.2 FGF2

FGF2 é um polipeptídeo constituído de 288 aminoácidos da família dos FGFs, que ao ser secretado ativa seu receptor FGFR2 na membrana celular de forma parácrina ou autócrina, que por sua vez irá desencadear uma via de sinalização. Essa família de fatores está ligada ao desenvolvimento embrionário, regeneração tecidual e alguns membros atuam como potentes fatores angiogênicos (Powers, 2000).

As células de melanoma expressam receptores de FGF2, além de secretarem esse fator de crescimento, podendo assim ocorrer um efeito autócrino, ao contrário dos melanócitos que possuem o receptor, mas são ativados pelo FGF2 secretado pelos queratinócitos quando estimulados por radiação UV (Metzner *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2011). A concentração de FGF2 é encontrado elevado nos fluidos corporais de pacientes com diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de pele (Jeffers, LaRochelle and Lichenstein, 2002). A expressão do FGF2, assim como de seu receptor FGFR2, pode estar aumentada nos cânceres malignos através de superexpressão e amplificação dos genes (Metzner *et al.*, 2011). Segundo Metzner e colaboradores (2011), FGF2 estimula a proliferação *in vivo* e a migração do melanoma *in vitro*, em concordância, a inibição de FGF2 em sinergismo com a inibição de B-RAF aumenta a apoptose das células do melanoma.

Em estudos relacionando o FGF2 e a crista neural de embriões de aves, Bittencourt (2013) observou um aumento de progenitores pluripotentes os mantendo indiferenciados. Observou também um estímulo à diferenciação das células para linhagens gliais e neuronais em detrimento da melanocítica, *in vitro*. Porém os progenitores só diferenciaram-se totalmente quando o FGF2 foi retirado da cultura. De acordo com Silva (2017), o FGF2 estimula a sobrevivência dos progenitores com potencialidade melanocítica. Entretanto o FGF2 diminui a expressão de *Mitf* nos progenitores da crista neural no decorrer da diferenciação celular.

Considerando os efeitos que os fatores de crescimento EGF e FGF2 exercem nas células da crista neural, torna-se necessário fazer uma avaliação comparativa dos resultados obtidos nos experimentos com o modelo de crista neural com o modelo de melanoma murino, tipo de célula derivada de células da crista neural.

2 Justificativa

O melanoma é um dos tipos mais agressivos de câncer, podendo originar metástases com facilidade, o que torna o tratamento mais difícil de alcançar um resultado satisfatório. Atualmente os compostos químicos que inibem vias de sinalização intracelular se mostram como boas alternativas para diminuir a proliferação celular. Entretanto, pelo câncer ser caracterizado como um aglomerado de células heterogêneas, algumas podem possuir outras vias que compensam o bloqueio, aumentando novamente a proliferação celular. Uma dessas vias possui o EGFR como receptor da cascata de sinalização.

Ao analisar a via de EGFR, Girotti e colaboradores (2012) identificaram que a expressão de EGFR está aumentada em células resistentes a inibidores de B-RAF (vemurafenib), levando a proliferação celular. Através deste resultado é necessário verificar se EGF pode estar atuando na proliferação de melanoma independente de possuir a mutação de B-RAF. Em concordância o FGF2 se mostra outro fator de crescimento a ser estudado devido à sua possível influência sobre a amplificação nas células de melanoma que contribuiriam para uma proliferação constante e resistência ao Vemurafenib.

Dados anteriores do nosso laboratório mostram a importância de EGF na diferenciação de progenitores da crista neural para melanócitos (Garcez, 2009), e de FGF2 no aumento de progenitores de células da crista neural. Entender se esses fatores atuam em melanoma de forma semelhante à atuação nas células da crista neural pode ser um importante passo para uma futura aplicação terapêutica nessa patologia.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Entender a importância dos fatores de crescimento EGF e FGF2 na proliferação e melanogênese de células de melanoma murino B16F10.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito dos fatores de crescimento EGF e FGF2 na proliferação das células B16F10 através de ensaio de MTS.
- Analisar a influência do EGF e do FGF2 na melanogênese das células B16F10 através de ensaio qualitativo e quantitativo de melanina.
- Analisar possíveis alterações nos níveis proteicos de Mitf ao tratar as células de melanoma com EGF ou FGF2.

4. Materiais e métodos

4.1 Cultura Celular

Os experimentos foram realizados utilizando cultura celular de melanoma murino B16F10, que é uma linhagem imortalizada do tumor de pele isolado de camundongo. O laboratório LACERT possui esta linhagem em seu banco de células preservadas em nitrogênio líquido. Para os experimentos as células foram descongeladas utilizando-se Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM 80%) contendo Soro Bovino Fetal (SBF 20%), penicilina (200 U/ml) e estreptomicina (10 µg/ml) a 37°C. Após, as células foram centrifugadas a 251 x g durante 5 min, descartado o sobrenadante, e as células, ressuspensas em DMEM contendo 10% de SFB, penicilina (200 U/ml) e estreptomicina (10 µg/ml), foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² (Corning). As culturas foram mantidas em estufa úmida de CO₂ (5%), a 37°C, trocando-se 2 ml dos 4 ml de meio total a cada 3 dias, sendo repicadas quando atingissem confluência total na garrafa de cultura.

4.2 Ensaio de proliferação celular por MTS

A análise da viabilidade celular após tratamento com EGF e FGF2 foi realizada utilizando-se o corante vital MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]. Para isso, foram plaqueadas 2x10³ células B16F10 por poço, em placas de 96 poços (Corning, NY, USA) contendo 100 µL de meio. Foi realizada uma curva de concentração de EGF utilizando as seguintes doses: 10ng/ml (grupo 2), 100ng/ml (grupo 3), 1000ug/ml (grupo 4), e 10ug/ml (grupo 5). Além disso, foi feito um grupo contendo FGF2 10ng/ml (grupo 6), e um grupo controle contendo apenas o meio básico (grupo 1). As análises foram realizadas 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Nos dias das análises foram adicionados 15µl de MTS (Promega) em cada poço pelo período de 3 horas em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, foram transferidos 80µl de cada poço para uma nova placa de 96 poços e posterior leitura de absorbância em espectrofotômetro de placa a 490nm.

4.3 Análise de melanogênese

Para as análises qualitativas e quantitativas de melanina foram plaqueadas 5×10^4 células por poço em placas de 6 poços (Corning). As células foram cultivadas em D-MEM contendo 10% SBF (Cultilab), penicilina (200 U/ml) e estreptomicina (10 μ g/ml). Após 24 horas de cultivo, e aderência das células na placa, foram trocados os meios de cultivo e adicionados os tratamentos. As condições de tratamento foram: EGF 10ng/ml (grupo 1), EGF 100ng/ml (grupo 2), α MSH 10 nM (grupo 3), IBMX 50 nM (grupo 4), FGF2 10 ng/ml (grupo 5) e uma condição com meio controle (grupo 6). O α MSH e o IBMX foram utilizados, pois na literatura são descritos como estimuladores da melanogênese, sendo assim considerados controles positivos para o experimento. Os meios de cultivo foram trocados no 3º dia. No 5º dia as células foram lavadas com PBS 1x, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS 1x + 10 SBF, e centrifugadas novamente para formação de *pellets*. A análise qualitativa foi realizada através da obtenção de fotografias dos *pellets* nos diferentes tratamentos, proveniente do conteúdo de melanina nas células precipitadas. Esse método foi realizado de acordo com metodologia descrita por Sato e colaboradores (2008).

Após as fotografias, os *pellets* foram ressuspensos com 150 μ l de NaOH a 2M e incubados em banho seco a 100°C por 20 min. As amostras foram homogeneizadas e em seguida adicionado 100 μ l de cada amostra por poço de placa de 96 poços, para análise quantitativa do conteúdo de melanina em espectrofotômetro a 405 nm (Sato *et al.*, 2008).

4.4 Análise de Mitf por imunocitoquímica

A presença de Mitf em células B16F10 foi avaliada por imunofluorescência. Para isso, foram plaqueadas 10.000 células B16F10 em cultura em placas de 96 poços cultivadas em D-MEM contendo 10% SBF. Um dia após foram lavadas com PBS 1x e fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min. As células foram novamente lavadas com PBS 1x e adicionado o PBS Triton 0,25%, para abrir poros na membrana, por 30 min. Em seguida, foi

realizada mais uma lavagem com PBS1x e adicionado SBF 5% diluído em PBS1x para inibir sítios inespecíficos. Após, foi adicionado o anticorpo primário anti-Mitf (1:500) (IgG produzido em camundongo - Abcam AB12039) e incubado *overnight* à 4°C. Após, as células foram lavadas com PBS Tween e foi adicionado o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-IgG de camundongo (1:1000) por 30 min, sendo então lavadas com PBS Tween. Foi utilizado o corante 4,6-diamidino-2-fenilindoldihidroclorido (DAPI) (Sigma Aldrich 0,1 µg/ml) (1:500) por 30 min para visualização dos núcleos. As placas foram observadas em microscópio epifluorescente invertido (Olympus IX71) e fotografadas em câmara (Olympus DP71).

4.5 Quantificação de proteínas por *Western Blotting*

Para a análise por *Western blotting* foram cultivadas 100.000 células em poços de placas de 6 poços por 24h. Após, as células foram lavadas com PBS1x e os extratos proteicos obtidos utilizando 20 µl de tampão RIPA (50mM trisaminometano (Tris), 150mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Deoxicolato de sódio, 1mM EDTA) por poço. Com o auxílio de um rodinho (*cell scraper*) as células foram lisadas e os extratos transferidos para um microtubo, e congelados em gelo seco por 10 min. Em seguida, os extratos foram centrifugados por 15 min a 14000 rpm a 4°C, sendo em seguida retirados os sobrenadantes e transferidos para um novo microtubo. A quantidade de proteínas foi dosada utilizando-se o kit DC ProteinAssay (Bio-Rad) utilizando uma curva padrão de BSA. Trinta microgramas de proteína por amostra foram submetidos a eletroforese em gel de acrilamida 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose utilizado Power Blot Cassete (Thermo Fisher) a 25V com amperagem constante de 1,7A, por 12 min. Em seguida, a membrana foi lavada em água destilada e corada com Ponceau para visualização das bandas. Os locais das bandas foram marcados e a membrana foi lavada 2 vezes com Tampão Fosfato Salina (PBS) contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T). O bloqueio foi realizado com leite 5% em TBS-T por 1h, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 min com TBS-T, sob agitação. O anticorpo anti-Mitf (1:1000), diluído em 5% de leite em TBS-T, foi colocado na

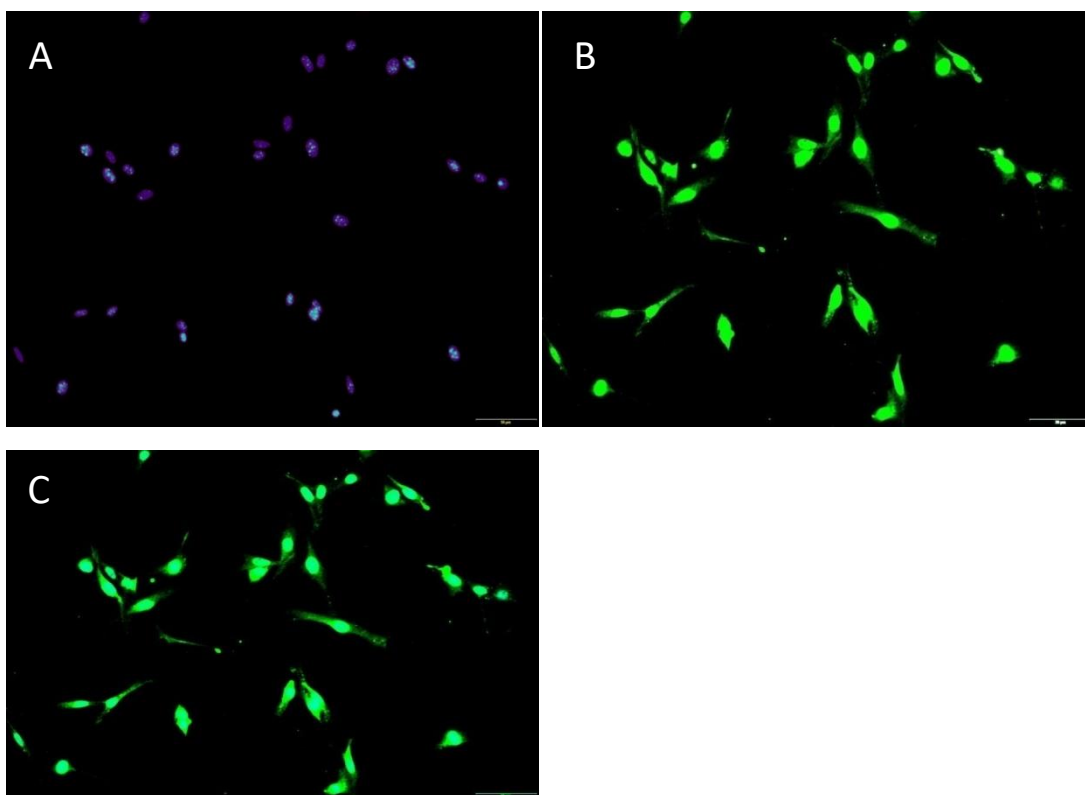
membrana e incubado overnight a 4°C, sob agitação. Após, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T por 5 min, sob agitação, e adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a HRP (1:10.000) por 1h, sob agitação, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T e foi utilizado o Kit de detecção de peroxidase ECL (Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit). O fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad) foi usado para a visualização das bandas referentes à proteína alvo.

5 Resultados

5.1 As células de melanoma murino B16F10 expressam Mitf

Mitf é um fator primordial na diferenciação de melanócitos, atuando como um fator de transcrição chave na melanogênese, através da regulação da expressão de enzimas atuantes na produção de melanina. A expressão de Mitf leva a uma diferenciação final dos melanócitos da pele e estando aumentado no melanoma, poderia atuar da mesma forma nessas células, promovendo sua diferenciação. Portanto, a sua expressão foi analisada nas células B16F10 para saber a porcentagem de células que o expressam. Através de análise de imunofluorescência para o fator de transcrição Mitf, e sobreposição das micrografias com os núcleos corados com DAPI, foi observado que todas as células B16F10 expressavam Mitf (figura 4).

Figura 4. Expressão de Mitf em células B16F10.



Fonte: Produzido pelo autor (2017)

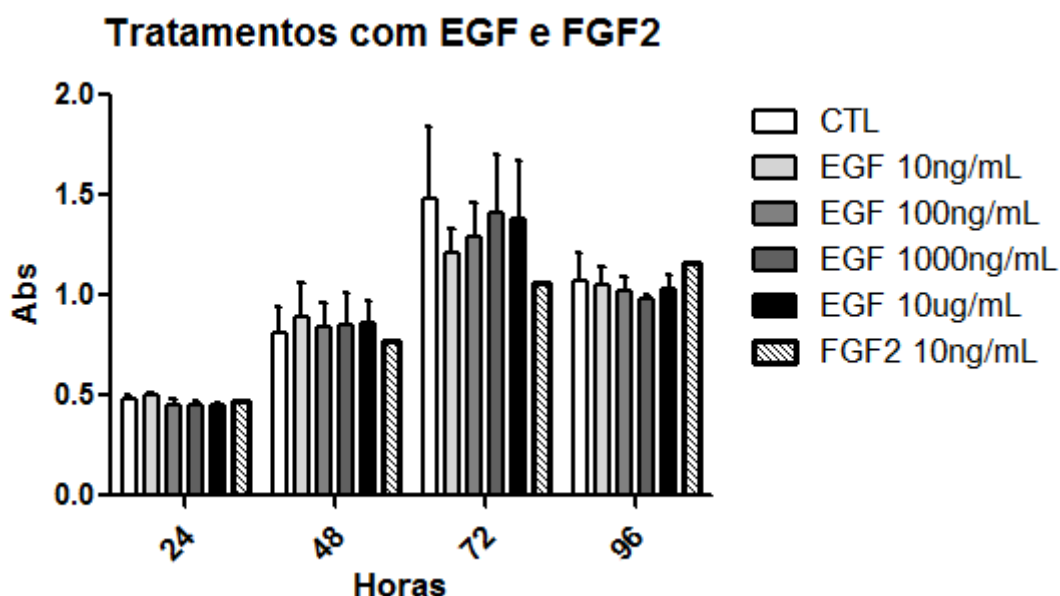
Nota: Foram realizadas culturas de células B16F10 em placas de 96 poços e, após fixadas, foi efetuada a imunofluorescência para Mitf. (A) Coloração das células com DAPI (azul); (B) Imunofluorescência para Mitf (verde); (C) Sobreposição de DAPI e Mitf.

5.2 Ensaio de viabilidade celular apresentou pequena variação na proliferação

Dados do laboratório demonstraram um aumento na proliferação de células da crista neural que expressavam Mitf, ao serem tratadas com EGF. Já segundo Bittencourt (2013) o FGF2 atua no aumento da proliferação de progenitores pluripotentes da crista neural. Portanto, para analisar se os mesmos efeitos proliferativos se repetiam com o melanoma, foram realizados ensaios de MTS com as células B16F10 ao serem tratadas com diferentes concentrações de EGF e FGF2.

Como observado na figura 5, em 24 horas o tratamento com diferentes concentrações de EGF e FGF2 não alterou a viabilidade celular em relação ao controle. Em 48 horas houve aumento na viabilidade em células tratadas com EGF, com destaque para a concentração 10ng/mL em que o aumento foi mais pronunciado. As demais concentrações de EGF, e o tratamento com FGF2, não alteraram a viabilidade celular em relação à condição controle nesse tempo. Em 72 horas houve uma diminuição na viabilidade das células tratadas com EGF e FGF2 em relação ao controle. Já em 96 horas, apenas o FGF2 apresentou uma maior viabilidade que a condição controle.

Figura 5. Ensaio de viabilidade celular por MTS das células B16F10 após tratamentos com EGF e FGF2.



Fonte: Produzido pelo autor.

Nota: Representação gráfica da viabilidade celular das células B16F10 realizada através de ensaios de MTS. Os dados mostram a viabilidade das células após 24, 48, 72 e 96h de cultivo em meio controle ou suplementado com EGF 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/ml e 10µg/ml ou FGF 10ng/ml. Os valores representam as médias \pm desvio padrão de triplicatas de dois experimentos independentes.

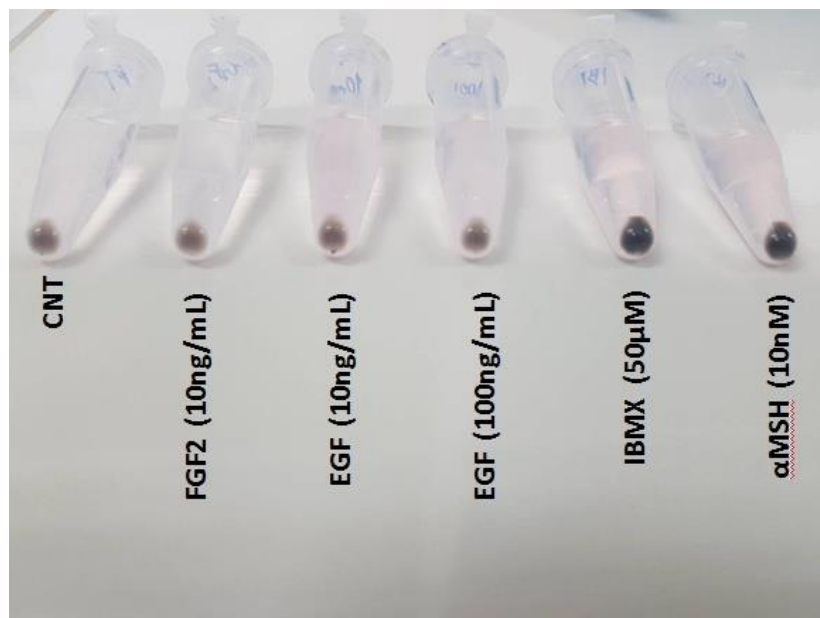
5.3 EGF e FGF2 não alteram a produção de melanina

5.3.1 Análise qualitativa de melanogênese

Segundo Dong e colaboradores (2011) o FGF2 proveniente dos queratinócitos exerce ação sobre a proliferação de melanócitos e consequentemente aumentam os níveis de melanina. Em concordância, estudos do nosso laboratório mostram um aumento de células Mitf-positivas ao serem tratadas as células da crista neural com EGF, o que poderia ser um indício de aumento de melanogênese. Por isso, analisamos o conteúdo de melanina das células B16F10 após tratamento com EGF e FGF2.

Na análise qualitativa da melanogênese é possível observar, através de fotografia, que não houve mudança na produção de melanina nas células de melanoma murino tratadas com EGF 10ng/mL, EGF 100ng/mL e FGF2 10ng/mL. Nos controles positivos, IBMX e α MSH é possível observar um nítido aumento na produção de melanina pela pigmentação mais escura dos *pellets* (Figura 6).

Figura 6. Ensaio qualitativo de melanogênese nas células B16F10



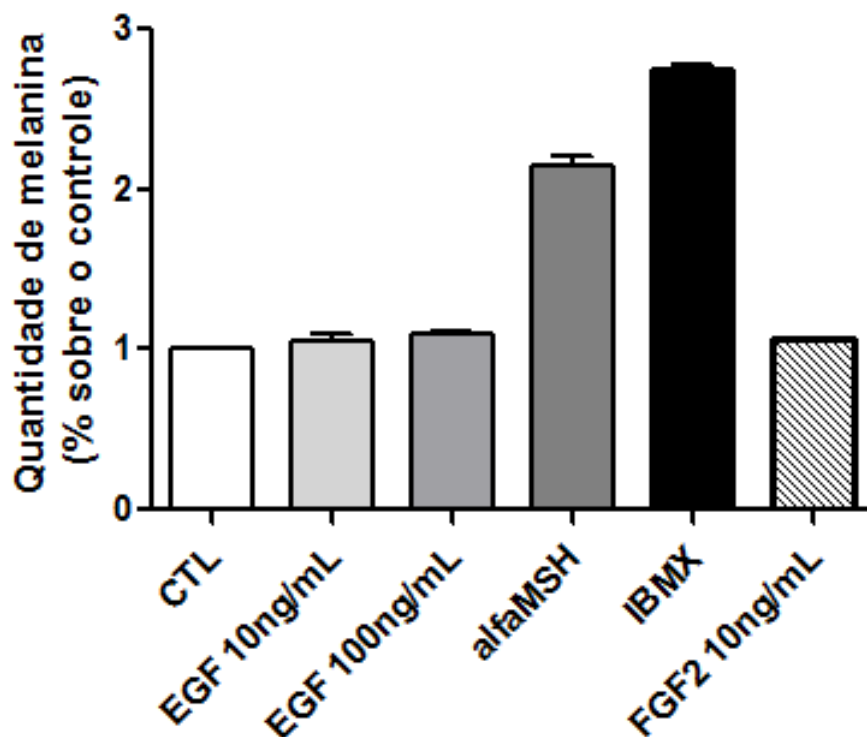
Fonte: Produzido pelo autor.

Nota: Fotografia dos *pellets* de melanoma B16F10. Ensaio de melanogênese através da ruptura da membrana celular e sedimentação da melanina através de centrifugações para avaliação da quantidade de melanina produzida pelas células nos respectivos tratamentos: Controle, FGF2 (10ng/mL), EGF (10ng/mL), EGF (100ng/mL), IBMX (50µM) e αMSH (10nM).

5.3.2 Análise quantitativa de melanogênese

A análise quantitativa da melanogênese corrobora a análise qualitativa, não havendo diferença estatística entre o controle negativo e as células tratadas com EGF 10ng ng/mL, EGF 100ng ng/mL e FGF2 10ng ng/mL. Entretanto há um aumento significativo, de mais que 2 vezes na produção de melanina no controle positivo com αMSH e de quase 3 vezes no controle positivo com IBMX (figura 7).

Figura 7. Quantificação de melanina por espectrofotometria



Fonte: Produzido pelo autor.

Nota: Gráfico da análise quantitativa da melanina produzida pelas células de melanoma murino B16F10 ao serem submetidas aos seguintes tratamentos: Controle, EGF (10ng/mL), EGF (100ng/mL), IBMX (50 μ M), α MSH (10nM) e FGF2 (10ng/mL). Os valores representam as médias \pm desvio padrão de triplicatas de dois experimentos independentes.

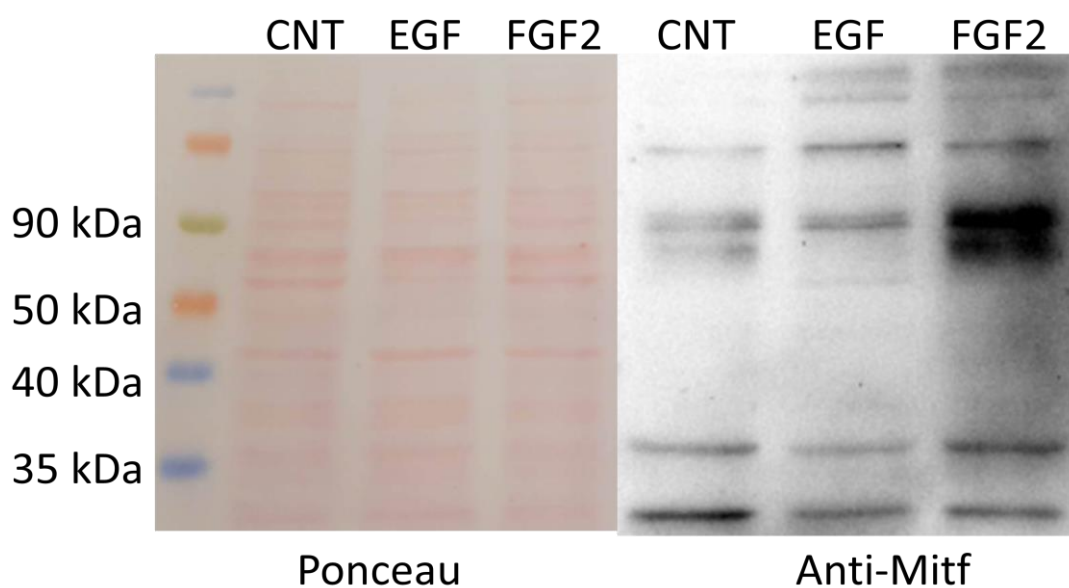
5.4 Quantificação de Mitf por *Western blotting*

Dados anteriores do nosso laboratório demonstram que células da crista neural tratadas com EGF diminuem a expressão de FoxD3, um importante fator de transcrição inibidor de Mitf, e aumenta o número de células Mitf-positivas (dados ainda não publicados). De maneira semelhante, FGF2 pode estimular a produção de Mitf em melanócitos, através do aumento da transcrição de Pax3 (Dong *et al.*, 2011). Portanto, para corroborar os experimentos anteriores obtidos em células de crista neural, foi realizada uma análise quantitativa de

Mitf, por *Western blotting*, em células de melanoma murino B16F10 após serem tratadas com EGF e FGF2.

Como pode ser observado na figura 8 o anticorpo secundário não se ligou de forma específica no anticorpo primário anti-Mitf, aparecendo várias bandas de proteínas após a revelação. Por isso, experimentos adicionais para padronização da técnica ainda serão realizados.

Figura 8. Teste colorimétrico de Ponceau e Western Blotting de Mitf



Fonte: Produzido pelo autor

Nota: Figura obtida através da coloração de Ponceau evidenciando as bandas transferidas e foto realizada com imunomarcacão utilizando anticorpo anti-Mitf, todas as bandas ficaram marcadas.

6 Discussão

Segundo dados anteriores do nosso laboratório, células da crista neural quando tratadas com EGF ou FGF2 sofrem uma influência para diferenciarem-se para o fenótipo melanocítico. O EGF, nas células da crista neural, diminui a expressão de FoxD3, um repressor de Mitf, e aumenta a proliferação de células Mitf-positivas (dados ainda não publicados). Já o FGF2 aumenta a proliferação de progenitores pluripotentes (Bittencourt *et al.*, 2013), além de também diminuir a expressão de FoxD3 e aumentar o comprometimento dessas células para o fenótipo melanocítico (Silva, 2017) Baseado no exposto, decidimos avaliar os efeitos do EGF e do FGF2 em outro modelo derivado de crista neural, o melanoma murino. Novas abordagens são necessárias para encontrar novos medicamentos para o tratamento do melanoma, e esse processo passa pela pesquisa básica, que norteia a descoberta de novas terapias. O melanoma pode servir como base para estudar as vias influenciadas por EGF e FGF2, para servir de modelo a outros cânceres que expressam os receptores destes fatores.

Inicialmente verificamos a expressão de Mitf nas células de melanoma murino B16F10 pela técnica de imunofluorescência. Todas as células, na condição controle, apresentaram a expressão do fator de transcrição Mitf com variação na intensidade de fluorescência. Portanto tornou-se necessária uma análise quantitativa da proteína através de *Western blotting*. No entanto, essa técnica ainda não está padronizada no LACERT. Durante o teste colorimétrico foi possível observar que as bandas estavam presentes após a transferência do gel de acrilamida para a membrana. Entretanto, houve marcações inespecíficas de todas as bandas presentes na membrana, e isto pode ter acontecido por não ter ocorrido inibição de sítios inespecíficos durante o bloqueio com leite.

Em seguida avaliamos se os fatores EGF e FGF2 influenciavam também a proliferação do melanoma murino, por ensaio de MTS. Nas primeiras 24 horas não houve diferenças significativas do controle em relação a nenhum grupo tratado. Em 48 horas houve um pequeno aumento na taxa de proliferação dos grupos tratados com EGF 10ng/mL. Em 72 horas todos os

grupos apresentam uma menor taxa de proliferação em relação ao controle, com destaque para FGF2 com diminuição. Em 96 horas o controle mostra um equilíbrio em relação às células tratadas com EGF e apenas o grupo FGF2 apresenta uma constância de aumento durante os dias de tratamento.

Segundo Mizuno (2005) os receptores EGFR são endocitados quando ativados pelo fator de crescimento EGF e ubiquitinados para posterior degradação nos lisossomos, importante para diminuição dos receptores e consequente diminuição de ativação levando a um sinal de parada na proliferação e na diferenciação da célula. Esse mecanismo pode explicar a diminuição da proliferação em 72 horas nos grupos tratados com EGF. Entretanto o EGF 0,01 ug/mL foi o que apresentou maior diferença em 72 horas. Em 96 horas houve um leve aumento de viabilidade no tratamento com FGF2, porém este aumento não foi pronunciado, o que poderia ser explicado pela alta densidade das células na placa, tendo saturado o FGF2.

Após as análises de proliferação, investigamos se o EGF e o FGF2 influenciavam de alguma forma na melanogênese das células de melanoma, já que em células da crista neural esses fatores influenciam no número de células pigmentadas (Teixeira, 2011; Silva, 2017). Na análise qualitativa de melanina, visualmente, é possível identificar um aumento da melanogênese nos tratamentos com IBMX e α MSH, utilizados como controles positivos. Entretanto, não é possível observar diferença significativa entre o controle e os grupos tratados com EGF e FGF2. A análise quantitativa de melanina valida os resultados encontrados, com um aumento nos tratamentos com IBMX, de quase 3 vezes, e α MSH, de mais de 2 vezes, porém sem alteração no conteúdo de melanina nas células de melanoma após tratamento com EGF e FGF2.

Com os resultados obtidos na melanogênese e na proliferação é possível observar que os tratamentos realizados com EGF e FGF2 não tiveram no melanoma os mesmo efeitos observados em células da crista neural. É importante ressaltar que em melanomas a proteína supressora de tumor INK4A está mutada em uma taxa alta, proteína que é ativada por Mitf e leva a parada do ciclo celular (Loercher *et al.*, 2004), ou seja, mesmo uma superexpressão de

Mitf nessas células não ativa INK4A, mantendo as células B16F10 em um alto estado proliferativo. Por outro lado, os melanócitos apresentam duas isoformas diferentes de Mitf, que pode ser positiva e negativa [(+) Mitf e (-) Mitf], diferindo por 6 resíduos na sua conformação. De acordo com Bismuth e colaboradores (2005), (+) Mitf possui uma capacidade inibitória da síntese de DNA diminuindo a capacidade proliferativa das células, por outro lado (-) Mitf não exerce esse bloqueio e sua expressão está relacionada com uma pausa no desenvolvimento de melanoblastos, o que inibe a melanogênese. Portanto, a regulação pós-transcricional pode estar atuando e favorecendo uma das isoformas nas células de melanoma.

Os resultados em melanócitos de crista neural evidenciam uma influência de EGF na melanogênese e de FGF2 na manutenção de progenitores melanocíticos, sendo que estes resultados não foram comprovados em células de melanoma B16F10. Devido às células de melanoma possuírem as vias de sinalização moleculares alteradas, fatores de crescimento podem perder, ou terem suas funções principais alteradas e atuarem em outras vias. Por isso, mais estudos são necessários para entender o papel de EGF e FGF2 na resistência de células aos tratamentos utilizados em terapias recentes para melanomas.

7 Conclusões

- O tratamento de células B16F10 com EGF apresentou pequena variação na viabilidade celular em 48 horas e posterior diminuição da viabilidade em 96 horas, em relação ao controle.
- O tratamento de células B16F10 com FGF2 apresentou ligeiro aumento na viabilidade celular apenas em 96 horas.
- Não houve diferença significativa na melanogênese das células B16F10 após tratamento com EGF e FGF2.
- Não foi possível quantificar o fator de transcrição Mitf por *Western blotting*.
- Com estes experimentos pode-se observar que o melanoma ao ser tratado com o EGF e FGF2 não apresenta os mesmos resultados que os tratamentos em modelo de crista neural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BISMUTH, K., MARIC, D. AND ARNHEITER, H. MITF and cell proliferation: the role of alternative splice forms. *Pigment Cell Research*, 18(5), pp.349-359, 2005.

BITTENCOURT, DENISE AVANI, DA COSTA, MELINE COELHOCALLONI, GIORDANO WOSGRAU et al. Fibroblast Growth Factor 2 Promotes the Self-Renewal of Bipotent Glial Smooth Muscle Neural Crest Progenitors. *Stem Cells and Development*, v. 22, n. 8, p. 1241-1251, 2013.

BOLLAG, G., TSAI, J., ZHANG, J., ZHANG, C., IBRAHIM, P., NOLOP, K. AND HIRTH, P. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(11), pp.873-886, 2012.

BOONE, BARBARA, JACOBS, KOENFERDINANDE, LIESBETH et al. EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 38, n. 6, p. 492-502, 2011.

BRACHER, ANDREAS, CARDONA, ANA SOLERTAUBER, STEFANIE et al. Epidermal Growth Factor Facilitates Melanoma Lymph Node Metastasis by Influencing Tumor Lymphangiogenesis. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 1, p. 230-238, 2013.

CHAN, X., SINGH, A., OSMAN, N. AND PIVA, T. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), p.1527, 2017.

CLARK, WALLACE H., ELDER, DAVID E. GUERRY, DUPONT et al. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, v. 15, n. 12, p. 1147-1165, 1984.

DONG, L., LI, YCAO, J et al. FGF2 regulates melanocytes viability through the STAT3-transactivated PAX3 transcription. *Cell Death and Differentiation*, v. 19, n. 4, p. 616-622, 2011.

FAJUYIGBE, DAMILOLAYOUNG, ANTONY R. The impact of skin colour on human photobiological responses. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 29, n. 6, p. 607-618, 2016.

GARCEZ, R. C, TEIXEIRA, B. L, SCHIMIDT, S. S, SILVA, M. A, TRENTIN, A. G et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. *Cellular and molecular neurobiology* 2009.

GIROTTI, MARIA R., PEDERSEN, MALINSANCHEZ-LAORDEN, BERTA et al. Inhibiting EGF Receptor or SRC Family Kinase Signaling Overcomes BRAF

Inhibitor Resistance in Melanoma. *Cancer Discovery*, v. 3, n. 2, p. 158-167, 2012.

HIROBE, T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 24, n. 3, p. 462- 478, 2011.

IBRAHIM, N. AND HALUSKA, F. Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), pp.551-579, 2009.

JEFFERS, M., LAROCHELLE, W. AND LICHENSTEIN, H. Fibroblast growth factors in cancer: therapeutic possibilities. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 6(4), pp.469-482, 2002.

LOERCHER, A., TANK, E., DELSTON, R. AND HARBOUR, J. MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *The Journal of Cell Biology*, 168(1), pp.35-40, 2004.

MATHEUS, L. G. M., VERRI, B. H. M. A. Aspectos epidemiológicos do melanoma cutâneo. *Revista Ciência e Estudos Acadêmicos de Medicina - Número 3*, PP.10-24, 2015.

METZNER, T., BEDEIR, A., HELD, G., PETER-VÖRÖSMARTY, B., GHASSEMI, S., HEINZLE, C., SPIEGL-KREINECKER, S., MARIAN, B., HOLZMANN, K., GRASL-KRAUPP, B., PIRKER, C., MICKSCHE, M., BERGER, W., HEFFETER, P. AND GRUSCH, M. Fibroblast Growth Factor Receptors as Therapeutic Targets in Human Melanoma: Synergism with BRAF Inhibition. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), pp.2087-2095, 2011.

MIZUNO, E. Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Down-Regulation by UBPY-mediated Deubiquitination at Endosomes. *Molecular Biology of the Cell*, v. 16, n. 11, p. 5163-5174, 2005.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. (2017). *Melanoma Treatment*. [online] Available at: <https://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq> [Accessed 22 Sep. 2017].

NCI Visuals Online: Image Details. [Visualsonline.cancer.gov](http://visualsonline.cancer.gov). Disponível em: <<https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=7279>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

OBAID, NOURAH, BEDARD, KARENHUANG, WEEI-YUARN. Strategies for Overcoming Resistance in Tumours Harboring BRAF Mutations. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 3, p. 585, 2017.

ONCOGENES AND TUMOR SUPPRESSOR GENES | AMERICAN CANCER SOCIETY. CANCER.ORG. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes/genetics/genes-and-cancer/oncogenes-tumor-suppressor-genes.html>>. Acesso em: 13 nov. 2017.

PORTAL - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. [Www2.inca.gov.br](http://www2.inca.gov.br). Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322 >. Acesso em: 13 nov. 2017.

PORTAL - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. [Www2.inca.gov.br](http://www2.inca.gov.br). Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma. Acesso em: 13 nov. 2017.

POWERS, C. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine Related Cancer*, 7(3), pp.165-197, 2000.

SATO, KAZUOMI, MORITA, MASAYUKI, CHIKAWA, CHIHIRO et al. Depigmenting Mechanisms of All-Trans Retinoic Acid and Retinol on B16 Melanoma Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 72, n. 10, p. 2589-2597, 2008.

SHAIN, A. HUNTER, YEH, IWEIKOVALYSHYN, IVANKA et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 20, p. 1926-1936, 2015.

SILVA, D. A. Avaliação dos mecanismos celulares e moleculares do fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF2) na migração, proliferação e diferenciação das células da crista neural truncal de codornas (*Coturnix coturnix japonica*). Tese de doutorado UFSC, 2017.

SLOMINSKI, A. et al. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. *Physiological Reviews*, v. 84, n. 4, p. 1155- 1228, 2004.

SOMMER, LUKAS. Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 24, n. 3, p. 411-421, 2011.

STEINS, M., REINMUTH, N., BISCHOFF, H., KINDERMANN, M. AND THOMAS, M. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer. *Onkologie*, 33(12), pp.704-709, 2010.

TEIXEIRA, B. L. Efeitos do fator de crescimento epidermal (EGF) na potencialidade e diferenciação das células da crista neural de aves. Dissertação de mestrado UFSC, 2011.

THOMAS, A. J.; ERICKSON, C. A. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 21, n. 6, p. 598-610, 2008.

TRAINOR, P. A.; Specification of neural crest cell formation and migration in mouse embryos. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 16, n. 6, p. 683-693, 2005.

WAGLE, NIKHIL, EMERY, CAROLINEBERGER, MICHAEL F. et al. Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. *Journal of Clinical Oncology*, v. 29, n. 22, p. 3085-3096, 2011.

WAN, PAUL T.C, GARNETT, MATHEW JROE, S.MARK et al. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell*, v. 116, n. 6, p. 855-867, 2004.