

## Plan Overview

---

*A Data Management Plan created using DMPTool*

**Title:** Copy of EVALUATION OF THE EFFECT OF HETEROTYPIC SIGNALING ON TUMOR PHENOTYPE MODULATION IN MELANOMA

**Creator:** André Zelanis - ORCID: [0000-0003-3066-6527](https://orcid.org/0000-0003-3066-6527)

**Affiliation:** Universidade Federal de São Paulo (unifesp.br)

**Funder:** São Paulo Research Foundation (fapesp.br)

**Template:** Digital Curation Centre (português)

### **Project abstract:**

Melanoma is a type of skin cancer that can progress according to multifactorial disorders. The ability of melanoma cells to invade and metastasize to organs distant from the body suggests their adaptability to different microenvironments. The imbalance of cellular homeostasis during oncogenesis together with the high heterogeneity of stromal cells associated with the tumor have a marked effect on the repertoire of proteins secreted by malignant cells. The metastatic potential of cancer cells is determined by factors that include the cells within the tumor microenvironment (tumor and stromal cells), as well as the factors released by these different cell populations. In this context, endothelial cells actively participate in the secretion of angiogenic factors that promote tumor growth and progression, in addition to secreting factors that enable the migration of tumor cells. Thus, the main objective of this project is to identify molecular patterns associated with the cross-talk of endothelial and tumor cells that contribute to the development and establishment of the pre-metastatic niche, as well as to its organotropism in melanoma.

**Start date:** 08-02-2021

**End date:** 07-02-2026

**Last modified:** 09-23-2022

### **Copyright information:**

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

---

# Copy of EVALUATION OF THE EFFECT OF HETEROTYPIC SIGNALING ON TUMOR PHENOTYPE MODULATION IN MELANOMA

Serão avaliados dados oriundos de análises *in vitro* e *in vivo*. Para ambas abordagens (descritas em detalhe abaixo), serão obtidos dados provenientes de (1) proteínas extraídas de lisado celular, (2) proteínas presentes no meio condicionado de células estimuladas e (3) proteínas presentes nos diferentes sítios metastáticos.

## Cultura celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo serão obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA). Serão utilizadas as linhagens A375 (melanoma humano metastático maligno, de fonte primária (CRL-1619TM) e uma linhagem primária de célula endotelial derivada de veia de cordão umbilical humano (HUVEC) (PCS-100-010TM). A linhagem celular A375 será cultivada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo 1,5 g / L de bicarbonato de sódio, estreptomicina 100 mg / L, ampicilina 25 mg / L, Glutamina 4 mM e 10% de Soro fetal bovino (SFB), enquanto que a HUVEC será cultivada em meio de cultura BASAL EBM2 (Lonza, Suíça) suplementado com KIT EGM2 (Lonza). As culturas celulares serão mantidas em incubadora, a 37°C em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar.

## Co-cultura (*mixed cells*) em meio de marcação metabólica (SILAC)

Para a co-cultura em formato *mixed cell*, inicialmente cada linhagem celular será cultivada separadamente em placas de cultura de 10 cm de diâmetro, contendo meio de cultura SILAC (*Stable Isotopic Labeling of Amino acids in Cell Culture*, ThermoFisher, EUA), da seguinte forma: as células endoteliais serão cultivadas com o meio SILAC contendo a versão “leve” dos aminoácidos lisina e arginina (L-Lys-0 e L-Arg-0), enquanto as células de melanoma serão cultivadas com o meio SILAC contendo átomos de isótopos “pesados” na composição dos aminoácidos Lisina e Arginina (L-Lys-8, 13C615N2 e L-Arg-10, 13C615N4). Para garantir um melhor rendimento na incorporação metabólica das diferentes versões isotópicas, as linhagens serão cultivadas em meio de cultura livre dos aminoácidos a serem incorporados (Lys e Arg) e contendo SFB dializado (SFBd) por, pelo menos, 6 passagens. A incorporação dos diferentes isótopos de Lys e Arg será verificada pela análise por espectrometria de massas do lisado de cada linhagem, observando a diferença de massa esperada para estes aminoácidos nas suas versões “leve” e “pesada”, conforme descrito adiante (no item 4.2). Uma vez confirmado o sucesso na incorporação metabólica, as células serão destacadas da placa de cultura separadamente e 5 x 10<sup>4</sup> da suspensão de cada linhagem será misturado (1:1, A375:HUVEC) em uma placa de 10 cm de diâmetro e, em seguida, a co-cultura será mantida por 24h nas condições de cultivo descritas acima, porém em meio SILAC desprovido de Lys e Arg e na presença de SFBd. É importante salientar que o tempo deste experimento de co-cultura será realizado num intervalo inferior ao tempo de dobramento de ambas as linhagens, para minimizar interferências do *turnover* proteico, sobretudo na condição metabolicamente marcada com as versões pesadas dos aminoácidos Lys e Arg.

## Obtenção dos lisados celulares, secretomas e meios condicionados

Decorridas 24h de incubação nas condições descritas acima, a co-cultura será lavada três vezes com tampão fosfato-salina (sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) momento em que as culturas serão separadas em (1) lisado celular, (2) secretoma (meio condicionado concentrado) e (3) meio condicionado. Para obtenção de (1), a co-cultura será submetida ao procedimento de lise celular, com auxílio de um *cell scraper*, por 3 min, em tampão de lise (CHAPS 2%, NaCl 150mM, HEPES 50mM, pH 7,5). Os lisados serão incubados em banho de gelo por 30 min, sob agitação seguido da centrifugação a 14.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante será retirado, quantificado pelo Método de Bradford<sup>42</sup> e armazenado a -80 °C até o momento do uso. Para obtenção de (2), (secretoma da co-cultura) o meio condicionado será colhido e centrifugado (2.200 x g, 10 min, 4 °C) para remover qualquer célula remanescente. Um coquetel de inibidores de protease (SIGMAFAST™, Sigma, EUA) será adicionado a amostra e

o secretoma será filtrado (filtro estéreis de 0,22 mm; Millipore, EUA) e, em seguida, submetidos a concentração (5.000 x g; 4 ° C) usando dispositivos de ultrafiltração (Vivaspin 20, *cut-off* de 3 kDa, GE Healthcare, EUA). Para obtenção dos meios condicionados (3), o procedimento será semelhante aquele descrito para (2), com exceção da ausência de etapa de concentração do material por ultrafiltração. O conteúdo proteico será avaliado pelo Método de Bradford<sup>42</sup>. Para todas as amostras, o material será obtido de forma independente, a partir de três réplicas biológicas da co-cultura (ou das culturas de cada linhagem individual, para fins de comparação). No momento de cada coleta a viabilidade celular será medida por análise de exclusão de corante (azul de tripan).

### **Análises proteômicas e bioinformática**

Tanto para os lisados celulares quanto para as proteínas concentradas a partir dos meios de cultura, um volume correspondente a 100 mg de proteínas será submetido à digestão tripsínica em solução utilizando o protocolo descrito por Liberato *et al.*, (2018)<sup>43</sup>. Brevemente, as proteínas serão desnaturadas pela adição de hidrócloro de guanidina (GuHCl) para uma concentração final de 3M, seguido da adição de ditioneitol (DTT, 5 mM concentração final) e incubação a 37°C por 1h. Em seguida será adicionada iodoacetamida (IAA, 15 mM concentração final) e a mistura incubada por 1h, no escuro, a temperatura ambiente. Para remoção do excesso de IAA, será adicionado DTT (15 mM, concentração final) e as amostras incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. A mistura será submetida a precipitação com acetona e metanol gelado por 2h e os *pellets* proteicos resultantes serão ressuspensos em NaOH (2.5 mM, concentração final), seguido da adição do tampão HEPES (50 mM, concentração final). Neste momento será adicionada tripsina (*Proteomics grade*, SIGMA, EUA) na proporção de 1:100 (m:m) e as amostras incubadas por 18h a 37°C. A solução de peptídeos resultante da digestão tripsínica em solução será dessalinizada utilizando-se extração em fase sólida com micro colunas C-1844 e quantificada utilizando o kit comercial *Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay* (ThermoFisher, EUA). A solução de peptídeos será seca em SpeedVac e ressuspensa em ácido fórmico 0.1% quando da análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). As análises por LC-MS/MS serão realizadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas-SP, por meio da submissão da proposta nas chamadas anuais de propostas do LNBio para o laboratório de proteômica. Alternativamente, as amostras poderão ser analisadas no Laboratório de Proteômica, da UNIFESP, campus São Paulo, em colaboração com o prof. Dr. Alexandre Tashima. SP. Os arquivos resultantes das corridas de LC-MS/MS (RAW files) serão submetidos à busca em banco de dados, utilizando o programa MaxQuant<sup>45</sup>, utilizando a versão mais recente do banco de dados UniProt/SwissProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) restrita à taxonomia *Homo sapiens*. Apesar da co-cultura ser realizada com uma mistura de células, a discriminação entre as proteínas derivadas de cada linhagem de estudo (endotelial e melanoma) será realizada utilizando duas buscas diferentes: uma considerando a incorporação metabólica de Lys e Arg nas suas versões “leve” (presente apenas nas células endoteliais) e outra, considerando a incorporação metabólica destes mesmos aminoácidos, porém nas suas versões “pesadas” (com uma diferença de massa de 18 Da entre as versões leve e pesada para cada peptídeo marcado metabolicamente). Para a análise proteômica dos secretomas, utilizaremos os mesmos parâmetros descritos por Liberato *et al.*, 2018<sup>46</sup>, porém considerando a incorporação metabólica de Lys/Arg. A análise estatística dos dados será realizada utilizando a linguagem R<sup>47</sup>, no ambiente de desenvolvimento integrado RStudio ([www.rstudio.com](http://www.rstudio.com)) com auxílio de *scripts* específicos.

### **Ensaio funcionais**

#### *Avaliação da capacidade de migração e invasão mediada pelo meio condicionado da co-cultura*

Para avaliar a influência dos diferentes meios condicionados nos eventos de migração e invasão,

utilizaremos o sistema *transwell*. As diferentes condições experimentais serão avaliadas pela inoculação, em placas de 24 poços, de 3x10<sup>4</sup> de células tumorais (A375), nos insertos localizados no compartimento superior das placas (poro de 8 mm, diâmetro 6,5 mm de diâmetro; Sarstedt, Alemanha). As células serão mantidas sem SFB no compartimento superior, por 24h. Findo este período, ao compartimento inferior serão avaliadas três condições: (1) 1 mL do meio condicionado da co-cultura, (2) 1 mL do meio condicionado da linhagem tumoral (A375), (3) 1 mL do meio condicionado da linhagem endotelial (HUVEC). As culturas serão mantidas sob estímulo por 24h. Para o experimento de invasão, os insertos serão previamente revestidos com Matrigel®(Corning, EUA) reidratado (200 mg/inserto). Decorrido o tempo de estímulo, os insertos serão removidos e lavados por 3 vezes com tampão fosfato-salina. As células que não migraram/invadiram serão cuidadosamente removidas da parte superior dos insertos com auxílio de um cotonete. As células aprisionadas nos insertos serão fixadas com solução de formaldeído a 3,7% seguido pela coloração com uma solução de cristal de violeta (1%). Finalmente, serão adicionados 200 µL de uma solução de SDS a 1% e, após 1 h, as absorbâncias das soluções serão avaliadas utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Meios de cultura DMEM contendo ou não 10% de SFB serão utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente.

### *Angiogênese - ensaio de formação de tubos*

A formação, *in vitro*, de tubos semelhantes a capilares por células endoteliais em uma matriz de membrana basal é um método recorrentemente utilizado para a triagem de fatores que promovem ou inibem a angiogênese. Para esse ensaio, as células endoteliais serão semeadas em Matrigel®, para formarem estruturas semelhantes a capilares, com um lúmen, seguindo o protocolo específico<sup>48</sup>. Brevemente, as células (4,5 x 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>) serão semeadas em placa de 96 poços, em meio BASAL EBM2 suplementado com KIT EGM2 (Lonza). Como controle positivo será adicionado o fator de crescimento de fibroblasto básico (b-FGF, adquirido de ThermoFisher, EUA), o estímulo a ser estudado será o meio condicionado derivado da co-cultura (obtido conforme descrito no item 4.1.2). Como controle negativo será adicionado meio de cultura DMEM sem SFB. Usando um microscópio invertido acoplado a uma câmera digital (aumento entre 4X a 10X), serão tiradas fotos num período de 24h, ou até que os tubos se formem.

### *Deteção de fatores pró-angiogênicos no meio condicionado*

A detecção de fatores pró-angiogênicos será realizada por meio de *western blot*, utilizando o secretoma das culturas celulares (A375, HUVEC e co-cultura) e os anticorpos primários específicos anti-angiogenin, anti-VEGF, anti-PDGF-B e anti-bFGF, todos obtidos da *Santa Cruz Biotechnology*, EUA. Alternativamente, outros anticorpos/sistemas de detecção poderão ser utilizados.

### *Zimografia*

A zimografia será realizada para se evidenciar a presença de proteinases com atividade sobre gelatina (um substrato incorporado ao gel de SDS-poliacrilamida). Será utilizado o método descrito por Heussen *et al.*<sup>49</sup> com algumas modificações. Para este ensaio, será utilizado um gel (10 x 8 cm x 1 mm) na concentração de 12% de poliacrilamida, contendo gelatina (na concentração final de 1mg/ml). A eletroforese ocorrerá em temperatura ambiente, voltagem de 150 V, corrente de 40 mA e sob condições não redutoras. Após a corrida o gel será lavado por 30 minutos em solução tampão Tris-HCL 50 mM pH 8,0, contendo 2,5% de Triton X-100, para a remoção do SDS presente no gel. Em seguida será lavado por 10 minutos com água destilada e imerso na solução de incubação (Tris-HCL 50mM pH 8,0 com 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, 200mM de NaCl e 0,02% CHAPS) por 18 horas a 37°C. Finalmente, o gel será submetido ao processo de revelação de bandas proteicas, utilizando o corante Comassie Brilliant Blue R-250 (Sigma). A avaliação da atividade proteolítica se dará com o aparecimento de regiões mais claras no gel, contrastando com o fundo azul (resultado da digestão do substrato presente na matriz poliacrilamida-gelatina).

## Monitoramento e análise *in vivo* do desenvolvimento tumoral após tratamento com o meio condicionado da co-cultura

Para a identificação da influência espaço-temporal dos fatores secretados pelas células endoteliais, em *cross-talk* com células tumorais, na formação do tumor primário e preparação do sítio pré-metastático, camundongos (NOD/SCID) fêmeas de 8 semanas de idade serão submetidas a injeção subcutânea da linhagem celular A375 ou de uma mistura de células tumorais/endoteliais derivadas da co-cultura (A375+HUVEC). Em todas as condições experimentais serão inoculadas  $1 \times 10^6$  células no dorso, pela via subcutânea. Cada grupo experimental irá consistir em pelo menos cinco animais. Previamente a adição das células (tumorais ou co-cultura), os camundongos serão injetados, pela via caudal (diariamente, por sete dias), com 300  $\mu$ L de meio condicionado derivado da co-cultura. Alternativamente, o grupo controle será injetado apenas com meio de cultura DMEM sem SFB e sem vermelho de fenol por sete dias antes da injeção das células. Os animais serão mantidos em ciclos diurnos de 12 horas, sem restrição alimentar. Para monitoramento de metástases os animais serão avaliados a cada 7 dias, num período total de 28 dias. Durante este período, os animais serão submetidos a um período de jejum por 12h e, em seguida, receberão injeção intravenosa (pela veia caudal) do análogo de glicose, 2-desoxi-2(18F) (FDG) (100  $\mu$ L de FDG, 3.5 MBq, em solução salina estéril). Decorrida 1h da aplicação de FDG, a metástase tumoral será acompanhada nos animais (anestesiados pela inalação de 1% de isoflurano), via tomografia por emissão de pósitrons (*PET scan*), utilizando um microtomógrafo computadorizado (Carestream Albira CT, EUA), disponível no parque de equipamentos multiusuário do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Ciência e Engenharia de Materiais (NAPCEM) do ICT-UNIFESP. Considerando como **dia 1** o momento da injeção das células, os animais serão sacrificados por inalação de dióxido de carbono em dias a serem definidos experimentalmente, de acordo com o surgimento e metástase tumoral. Uma porção (~50 mg de tecido, a depender do tamanho) dos tumores primários, bem como órgãos nos quais a metástase eventualmente tenha sido identificada, será submetida à lise celular utilizando um homogeneizador de tecidos em tampão de lise (2% CHAPS, NaCl 200 mM e HEPES 50 mM pH 7,5, suplementado com a adição de coquetel inibidor de protease) e submetidas à lise mecânica utilizando um homogenizador (BioGen Pro 200, EUA). O extrato proteico obtido a partir destes tecidos será submetido à digestão com tripsina conforme descrito anteriormente (item 4.2) para a análise proteômica. Por fim, o extrato proteico das amostras de tecido poderá ainda ser interrogado por *Western blot* quanto à expressão de marcadores de sítio pré-metastático previamente descritos em melanoma, tais como anti-VEGFR1, anti-VLA4, anti-CD11b. Eventualmente outros marcadores poderão ser interrogados/validados dependendo dos dados de proteômica resultantes da análise tecidual.

Os dados provenientes da análise bioinformática (proteômica) serão apresentados na forma de planilha, com os respectivos arquivos RAW (arquivo bruto referente à corrida no espectrômetro de massas), bem como as informações associadas (geralmente, o output dos softwares de busca de dados em proteômica). O tamanho dos arquivos, bem como quaisquer outras informações associadas, estarão disponíveis na mesma planilha.

Não há conflitos de interesse declarados. Esta questão não se aplica ao projeto uma vez que ele não versa sobre o estudo com seres humanos.

Respeitando-se um período de embargo associado à publicações em periódicos científicos, todos os dados adquiridos neste projeto serão tornados públicos por meio da plataforma ProteomeXchange (<http://www.proteomexchange.org/>)

Os dados serão armazenados localmente, num servidor DELL PowerEdge T440. O Backup será realizado mensalmente. Além disso, os dados correspondentes às análises por espectrometria de massas serão submetidos à repositórios internacionais (<http://www.proteomexchange.org/>).

O acesso ao servidor local é realizado mediante senha (acesso local) e verificação em duas etapas (acesso remoto). Apenas pessoas ligadas ao projeto (estudantes e coordenador) terão acesso às senhas.

Todos os dados referentes às análises proteômicas (RAW files) são de valor a longo prazo e devem ser mantidos, compartilhados e / ou preservados (conforme descrito anteriormente).

O servidor que armazenará os dados dispõe de uma grande capacidade de armazenamento. De qualquer forma, ainda que esta capacidade se aproxime do limite, os dados serão armazenados em HDs externos. É pertinente salientar que, o depósito dos dados em repositórios internacionais como o ProteomeXchange garantem um 'cloud backup' disponível a qualquer momento.

Conforme informado anteriormente, respeitando-se um período de embargo associado à publicações em periódicos científicos, todos os dados adquiridos neste projeto serão tornados públicos por meio da plataforma ProteomeXchange (<http://www.proteomexchange.org/>). Solicitações de acesso/compartilhamento de dados que eventualmente ocorram durante o período de embargo, serão analisadas caso a caso.

Respeitando-se apenas o embargo da divulgação dos artigos científicos, em princípio não.

O coordenador do projeto (André Zelanis) e os estudantes associados.

O laboratório já dispõe de um servidor para o armazenamento dos dados, de forma que recursos adicionais (no momento) não serão necessários. De toda forma, o projeto de pesquisa vigente (FAPESP 2019/07282-8) será suficiente para a manutenção e gerenciamento dos dados.

---