

Ingridy Izabella Vieira Cardoso

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO *SLUG* NOS
TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós - Graduação da Fundação Pio
XII Hospital de Câncer de Barretos para
obtenção do título de Mestre em Oncologia
Molecular.

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Mariana Tomazini Pinto

Barretos, SP
2024

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Hospital de Câncer de Barretos através do auxílio de bolsa de mestrado pelo Edital N. 030/2021, e apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através do Auxílio à Pesquisa Jovem Pesquisador da Dra. Mariana Tomazini Pinto (Processo número 2019/07502-8).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e do Hospital de Câncer de Barretos.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram, ainda, que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu coragem, força de vontade, determinação e sustento todos os dias para realizar esse estudo.

Meus agradecimentos ao Hospital de Câncer de Barretos, ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM), ao grupo de pesquisa em neurooncologia, principalmente ao Dr. Rui Manoel Vieira Reis, Dr. Daniel Moreno Antunes e a aluna Me. Ideli Zanesco Fontes Baptista, pela oportunidade de conhecer a magnitude do Hospital. Ao CPOM por todo incentivo que recebi desde o primeiro contato e no auxílio nas análises de bioestatística e bioinformática dos dados gerados.

Agradeço o meu Grupo de Pesquisa em Oncologia Pediátrica (GPOPed) por todo acolhimento, apoio, tempo e paciência para me ensinar e ajuda nas minhas dificuldades, padronizações, experimentos, principalmente a Dr^a Marcela.

Agradeço a minha família, principalmente minha mãe, meu pai, minha avó e meu tio, por todo amor e compreensão pela ausência durante o tempo que estive dedicada a esse estudo. Agradeço também meu namorado, Msc. Abu-Bacr por todo apoio e companheirismo principalmente no final do meu mestrado, onde sempre estava com os braços prontos para me abraçar e dar aconchego.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Mariana Tomazini Pinto, que me recebeu com todo seu conhecimento, sabedoria e vontade de ensinar, sendo meu maior exemplo de resiliência, perseverança e fé durante todo o processo de aprendizado e execução do presente estudo.

Meus agradecimentos aos meus colegas e amigos do CPOM, principalmente do laboratório de Biologia Celular, por toda paciência, tempo de ensino, organização e incentivo, Katiane Tostes, Gabriela Karam, Samuel, Tauana, Raquel, Joyce, Carol Shibuya, Msc. Patrik, Giulia, Maria Clara, Msc. Julia Dias, Igor Fagundes, Giulia Franco, Dr^a Ana Caroline Martins, Msc. Karina, Dr^a Izabela Faria, Dr Renato José, Dr^a Carolina Laus e demais amigos e colegas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Tumores de células germinativas (TCGs)	14
1.1.1	Classificação dos tumores de células germinativas	15
1.1.2	Diagnóstico e tratamento dos tumores de células germinativas	16
1.2	Transição epitélio-mesenquimal (EMT)	17
1.2.1	Células epiteliais e mesenquimais	19
1.2.2	Tipos de EMT	21
1.2.3	Fatores de transcrição relacionados à EMT	23
1.2.5	Vias de sinalização e alvos terapêuticos	25
1.2.6	Inibidores diretos dos fatores de transcrição	29
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo primário	33
3.2	Objetivos secundários	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Análise <i>in silico</i> dos marcadores da EMT em TCG	39
4.2	Cultivo de linhagens de tumores de células germinativas (TCGs)	37
4.3.1	Processo de transformação de bactérias competentes	37
4.3.2	Cultura de bactérias em meio líquido	39
4.3.3	Extração do DNA plasmidial	39
4.3.4	Produção de lentivírus em células HEK293FT (transfecção)	39
4.3.5	Transdução das linhagens de tumores de células germinativas com lentivírus	40
4.4	Análise da expressão gênica	41
4.5	Análise da expressão de proteínas	42
4.6	Ensaio de migração celular	42
4.7	Ensaio de invasão celular	43
4.8	Ensaio de viabilidade celular – MTS	43
4.9	<i>xCELLigence</i>	44
4.10	Imunofluorescência	44
4.11	Análises estatísticas	45

4.12	Considerações éticas	45
5	RESULTADOS	46
5.2	<i>Screening</i> das linhagens de tumores células germinativas	51
5.3	Silenciamento de <i>SLUG</i>	52
5.4	Expressão dos marcadores da EMT	53
5.5	Ensaio de migração	54
5.6	Ensaio de invasão	55
5.7	Ensaio de viabilidade celular- MTS	56
5.8	Ensaio de proliferação celular- <i>XCELLigence</i>	56
5.9	Imunofluorescência	57
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	64
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXOS	76
	Anexo A. Termo de aceite do artigo científico na revista <i>Molecular Medicine Reports</i> , seguido do artigo científico na íntegra.	76
	Anexo B. Identificação das amostras (ID) dos TCG misto e as porcentagens de cada histologia.	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação dos locais primários dos TCGs de acordo com faixa etária. Incluindo a incidência em menores de 18 anos: cérebro 20%, mediastino 4%, abdômen 4%, cóccix 18%, ovário 27%, testículo 25% e outros 2%. Em maiores de 18 anos apresenta as incidências: cérebro 3%, mediastino 10%, abdômen 2%, cóccix sem evidências, ovário 10%, testículo 85%¹¹.

15

Figura 2- Representação dos tipos histológicos dos TCGs de acordo com a tumorigênese, célula precursora, via de diferenciação e os principais marcadores, Gonadotrofina Coriônica Fração β (Beta hCG) e Alfa Fetoproteína (AFP). Fonte: Adaptado e traduzido de F Shaikh 2016⁶

17

Figura 3- Representação do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT). Fonte: Adaptado de Kalluri & Weinberg, 2009^{25,26}.

21

Figura 4- Representação dos tipos de EMT (EMT-1, EMT-2 e EMT-3) e suas respectivas influências sobre a diferenciação das células. Fonte: Adaptado de Marconi, 2021⁵⁶.

23

Figura 5- Papel de SNAIL e SLUG na transição epitelial-mesenquimal. O esquema mostra as vias gerais de sinalização que regulam o SNAIL e SLUG e alguma das moléculas conhecidas por ser afetadas por esses fatores de transcrição²⁶. Fonte: Criado com BioRender.com.

24

Figura 6- Representação das vias de sinalização indutoras da transição epitélio- mesenquimal (EMT). Fonte: Criado com BioRender.com.

25

Figura 7- Alvos terapêuticos e inibidores da EMT. Existem três estratégias terapêuticas com fármacos em estudos clínicos e pré-clínicos para interferir no processo de EMT no tratamento tumoral, podendo assim reduzir o potencial metastático: i) Fármacos relacionados a inibição da ativação das vias de sinalização, WNT, TFG-beta e Notch; ii) inibição direta da EMT através de diversos mecanismos; iii) bloqueadores farmacológicos direcionados para a transcrição dos genes relacionados com a EMT.

29

Figura 8- Fluxograma da estratégia experimental adotada no presente projeto.

34

Figura 9- Plasmídeos utilizados para a realização do *knockdown* de *SLUG*. A) Plasmídeo de envelope viral-pCVM-VSV-G. B) Plasmídeo de empacotamento- pCMV delta R8.2. C) Plasmídeo com a sequência shRNA e GFP.

38

Figura 10- Representação do protocolo de silenciamento de *SLUG*. A transfecção foi realizada nas células HEK293FT usando os plasmídeos de interesse e o reagente Lipofectamina. O sobrenadante contendo os lentivírus foi coletado, filtrado e utilizado para a transdução das células 1777N, com auxílio do polibrene. As células GFP+ foram selecionadas por puomicina.

41

Figura 11- Gráfico de setores representando os tipos histológicos considerados nas análises in silico. Os dados dos pacientes com tumores de células germinativas testiculares (TCGT) foram obtidos na plataforma cBioPortal e foram considerados as histologias seminoma (n=49), carcinoma embrionário (n=11) e TCG misto (n=29).

46

Figura 12- *Heatmap* da expressão dos genes relacionados com a EMT em carcinoma embrionário (azul), TCG misto (vermelho) e seminoma (verde). A) *Heatmap* dos genes relacionados com a EMT. B) *Heatmap* de 17 fatores de transcrição envolvidos na EMT. As linhas indicam os níveis de expressão relativos para um único gene e as colunas indicam o nível de expressão para uma única amostra. Azul e vermelho indicam os genes com níveis de expressão mais baixos e mais altos, respectivamente. 47

Figura 13- Boxplot da expressão de SNAIL e SLUG nos TCG testicular. Expressão de SLUG (A) e SNAIL (B) em carcinoma embrionário, TCG misto e seminoma. 48

Figura 14- Sobrevida livre de progressão dos pacientes com TCG testicular. Sobrevida livre de progressão considerando os tipos histológicos carcinoma embrionário (CE), TCG misto e seminoma (SE). 49

Figura 15- Sobrevida livre de progressão dos pacientes com TCG testicular baseadas na expressão dos genes *SNAIL* e *SLUG*. Associação da expressão individual dos fatores de transcrição (A) *SNAIL* e (B) *SLUG* com sobrevida livre de progressão (PFS). C) Associação da combinação da expressão de *SNAIL* e *SLUG* com PFS. A correção de Bonferroni foi aplicada após o teste de log-rank com $\alpha=0,05/3=0,0167$ para (A) e $\alpha=0,05/6=0,0083$ para (D). *Valor significativo para log-rank + Bonferroni. Valores de p iguais ou menores que o limiar de correção de Bonferroni foram considerados significativos. 51

Figura 16- Análise da expressão de *SLUG* em diferentes linhagens de tumor de células germinativas. A) Expressão gênica de *SLUG*, nas linhagens 1777N, 577MF, JEG-3 e NTERA-2. B) Expressão proteica de *SLUG* nas linhagens 1777N, 577MF, JEG-3 e NTERA-2. 52

Figura 17- Silenciamento de *SLUG* na linhagem 1777N. A) Imagens do silenciamento de *SLUG* (shSLUG) e controle (shNSC) nas células 1777N, obtidas no campo claro e com marcação GFP (*Green Florescent Protein* - proteína verde fluorescente), no aumento de 10x. B) Análise da expressão proteica de *SLUG* nas células 1777N transduzidas com shNSC e shSLUG. 53

Figura 18- Análise da expressão dos genes relacionados com a EMT nas linhagens 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG). A) Avaliação da expressão gênica de *SLUG*, *E-CAD*, *N-CAD*, *VIM* e *SNAIL* nas linhagens 1777N shNSC e shSLUG (n=2). B) Expressão proteica do marcador epitelial E-CADERINA nas linhagens 1777N shNSC e shSLUG (n=2). C) Expressão proteica do marcador mesenquimal N-CADERINA nas linhagens 1777N shNSC e shSLUG (n=1) 54

Figura 19- Ensaio de migração celular nas células 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG). A) Imagens representativa do ensaio de migração obtidas no aumento de 10x. B) Análise da porcentagem de migração celular. Experimentos realizados em duplicata. 55

Figura 20- Ensaio de invasão nas células 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG). A) Imagens representativa do ensaio de invasão, obtidas no campo claro e no aumento de 10x. B) Análise da invasão celular demonstrando o número de células invasivas. Experimentos realizados em duplicata. 55

Figura 21- Viabilidade das células 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG) após o tratamento com cisplatina. A) A célula 1777N shNSC apresentou dose de IC₅₀ maior (IC₅₀=12,51) em relação a 1777N shSLUG (IC₅₀=16,68). Os experimentos foram realizados em duplicada. B) Representação da média dos IC₅₀ das células 1777N shNSC e shSLUG. P=0.0290.

56

Figura 22- Análise da proliferação das linhagens 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG) após tratamento com cisplatina por 24 horas. A) Representação da proliferação das células shSLUG (vermelho) e shNSC (azul) tratadas com Cisplatina e NaCl com 24 horas após plaqueamento e acompanhadas até 72 horas. B) Comparação das células shSLUG e shNSC tratadas com e sem cisplatina. *P ≤ 0,0001.

57

Figura 23- Análise da expressão de *SLUG* nas linhagens 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG) após 24 horas de tratamento com cisplatina. Marcação feita com anti-*SLUG* (vermelho), GFP (verde), DAPI (azul). MERGE 01: DAPI+anti-*SLUG* e MERGE 02: DAPI+GFP. Imagem obtidas no aumento de 60x. O tratamento com cisplatina foi realizado com 5,3μM e o grupo controle foi tratado com NaCl.

58

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Relatório dos casos de pacientes atendidos e diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos (Fonte: Núcleo de atendimento a pesquisa do Hospital de Infantojuvenil de Barretos).	14
Tabela 2- Genes relacionados com a EMT que foram avaliados nas análises in silico.	36
Tabela 3- Tabela com as porcentagens das três amostras de TCG misto com as porcentagens dos tipos histológicos que as compõem.	48

Lista de abreviações

TCG	Tumor de célula germinativa
CE	Carcinoma embrionário
SE	Seminoma
TCG misto	Tumor de célula germinativa misto
TCGT	Tumor de célula germinativa testicular
Beta hCG	Gonadotrofina Coriônica Fração β
AFP	Alfa Fetoproteína
DHL/LDH	Lactato desidrogenase
EMT	Transição epitélio mesenquimal
EMT-1	Transcrição epitélio mesenquimal do tipo 1
EMT-2	Transcrição epitélio mesenquimal do tipo 2
EMT-3	Transcrição epitélio mesenquimal do tipo 3
MET	Transição mesenquimal para epitelial
GFP	<i>Green Florescent Protein</i> - proteína verde fluorescente
μ l	Microlitros
CIS	Cisplatina
NaCl	Cloreto de sódio
sh	<i>short hairpin</i> - Sistema de silenciamento celular
shNSC	<i>short hairpin non-silencing control</i> - controle do silenciamento celular
shSLUG	<i>short hairpin</i> direcionado para o gene <i>SLUG</i>
SLP	Sobrevida livre de progressão
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
ANTI-	Anticorpo
EMT-TFs	Fatores de transcrição relacionados com o processo de transcrição epitelial mesenquimal

RESUMO

Os tumores de células germinativas (TCGs) são tumores heterogêneos, tornando desafiador o estudo de sua base genética e a identificação de alternativas moleculares para a classificação histológica. Um dos mecanismos críticos na progressão tumoral é a transição epitélio-mesenquimal (EMT), durante a qual células epiteliais perdem características típicas e adquirem um fenótipo mesenquimal. Fatores de transcrição como *SNAIL* e *SLUG* são essenciais na regulação da EMT. Estudos demonstraram que a alta expressão de *SLUG* está correlacionada com pior prognóstico em vários tipos de câncer, entretanto a expressão de *SLUG* em TCGs permanece não elucidada. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel da expressão do fator de transcrição *SLUG* nos tumores de células germinativas. Para tanto, a expressão de *SLUG* foi avaliada *in silico* utilizando banco de dados de TCGs. O silenciamento de *SLUG* foi realizado na linhagem celular de TCG de carcinoma embrionário (1777N) e a capacidade de migração e invasão celular foram avaliadas. Ademais, as células com inibição de *SLUG* (shSLUG) foram tratadas com cisplatina e a proliferação e morfologia das células foram avaliadas. As análises *in silico* mostraram que a expressão de *SNAIL* não impactou a sobrevida livre de progressão (PFS) em pacientes com TCGs, mas a alta expressão de *SLUG* foi associada a uma pior PFS. A inibição de *SLUG* na linhagem 1777N não alterou a invasão e migração das células. Ao tratar as células com cisplatina, observou-se aumento da proliferação nas células shSLUG independente do tratamento com cisplatina. As análises de imunofluorescência mostraram que após o tratamento com cisplatina, as células 1777N controle e shSLUG apresentaram alterações morfológicas, adquirindo um formato mais fusiforme e demonstrando menor adesão célula. Todos esses dados sugerem que a alta expressão de *SLUG* tem impacto na PFS dos pacientes com TCGs, mas em modelos *in vitro* a sua expressão não altera os processos biológicos incluindo migração e invasão celular. A inibição de *SLUG* aumenta a proliferação celular, independente do tratamento com cisplatina. Portanto, a avaliação da expressão e do papel de *SLUG* em modelos que mimetizam o comportamento do tumor em organismos vivo é essencial para aprofundar a compreensão de sua função no desenvolvimento e progressão dos TCGs. Ademais, tal abordagem pode contribuir para a identificação de potenciais alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Tumor de Células Germinativas; Transição epitélio-mesenquimal; *SLUG*.

ABSTRACT

Germ cell tumors (GCTs) are heterogeneous, making it challenging to study their genetic basis and identify molecular alternatives for histological classification. One of the critical mechanisms in tumor progression is the epithelial-mesenchymal transition (EMT), during which epithelial cells lose typical characteristics and acquire a mesenchymal phenotype. Transcription factors such as *SNAIL* and *SLUG* are essential in regulating EMT. Studies have shown that high *SLUG* expression is correlated with worse prognosis in several types of cancer; however, the expression of *SLUG* in GCTs remains unclear. Therefore, this study aimed to evaluate the role of *SLUG* transcription factor expression in germ cell tumors. *SLUG* expression was evaluated *in silico* using a GCT database. *SLUG* silencing was performed in embryonal carcinoma GCT cell lines (1777N), and cell migration and invasion capacities were assessed. Furthermore, *SLUG*-inhibited (shSLUG) cells were treated with cisplatin, and cell proliferation and morphology were evaluated. *In silico* analyses showed that *SNAIL* expression did not impact progression-free survival (PFS) in patients with GCTs, but high *SLUG* expression was associated with worse PFS. *SLUG* inhibition in the 1777N cell line did not alter cell migration or invasion. When treated with cisplatin, shSLUG cells exhibited increased proliferation, regardless of cisplatin treatment. Immunofluorescence analyses showed that after cisplatin treatment, both control and shSLUG 1777N cells underwent morphological changes, acquiring a more spindle-shaped form and demonstrating reduced cell adhesion. These findings suggest that while high *SLUG* expression impacts the PFS of patients with GCTs, its expression *in vitro* does not alter biological processes such as cell migration and invasion. However, *SLUG* inhibition increases cell proliferation independently of cisplatin treatment. Therefore, evaluating *SLUG* expression and its role in models that mimic tumor behavior in living organisms is essential to deepen the understanding of its function in the development and progression of GCTs. Furthermore, such an approach may contribute to the identification of potential therapeutic targets.

Keywords: Germ Cell Tumor; Epithelial-Mesenchymal Transition; SLUG.

1 INTRODUÇÃO

O câncer infantojuvenil é a primeira causa de morte por doença e a segunda causa de óbito em geral em crianças e adolescentes de 1 a 19 anos¹. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que, para o triênio 2023/2025 ocorrerão, aproximadamente 7.930 novos casos de câncer infantojuvenil por ano no Brasil². O câncer é um conjunto de diferentes tipos tumorais que têm como semelhança o descontrole do ciclo celular e alterações na funcionalidade das células, podendo ocorrer em diversas partes do organismo^{3, 4}. Os tumores pediátricos diferem-se dos adultos por diversos motivos, incluindo histogênese, instabilidade genômica, resistência aos tratamentos e origem, os quais são predominantemente de natureza embrionária⁴.

Nas últimas décadas, o entendimento e a implementação de protocolos de diagnóstico, manejo clínico e tratamentos para os diferentes tipos de tumores pediátricos foi extremamente significativo. Em torno de 80% das crianças e dos adolescentes acometidos pela doença podem ter remissão completa se diagnosticados precocemente e tratados em centros especializados. Porém, 20% desses pacientes apresentam resistência ao tratamento, o que demonstra necessidade de mais estudos com o intuito de entender os mecanismos envolvidos com a resistência dos pacientes^{1, 2}.

Dentre os centros especializados, está o Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos com média de 234 atendimentos de casos novos de pacientes pediátricos por ano, sendo essa média contabilizada entre os anos de 2012-2023 e feita em relação ao diagnóstico de diferentes tipos tumorais (sistema nervoso central-SNC, tumores hematológicos, Ewing, Wilms, retinoblastoma, neuroblastoma, rabdomiossarcoma, sarcoma não rabdomiossarcoma, cabeça e pescoço, tumor de célula germinativa, entre outros) conforme Tabela 1.

Tabela 1- Relatório dos casos de pacientes atendidos e diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos (Fonte: Núcleo de atendimento a pesquisa do Hospital de Infantojuvenil de Barretos).

DIAGNÓSTICO	2012 (#188)	2013 (#165)	2014 (#222)	2015 (#238)	2016 (#237)	2017 (#301)	2018 (#294)	2019 (#284)	2020 (#186)	2021 (#240)	2022 (#243)	2023 (#188)
	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº	Nº
SMD	1	3	10	16	19	17	14	22	13	15	8	9
LLA	18	16	25	21	25	26	36	25	19	17	20	13
LMA	9	2	4	13	10	11	8	6	7	9	10	10
LMC	1	0	1	2	2	0	0	1	1	0	1	1
LH	15	12	11	12	7	24	18	22	6	16	15	8
LNH	14	5	8	22	8	23	14	14	10	6	10	5
Sarcoma não-Rabdomiossarcoma	4	4	7	3	9	6	5	11	5	9	8	3
Rabdomiossarcoma	13	9	6	7	7	8	11	8	4	8	6	7
Neuroblastoma	5	8	16	12	10	14	12	14	12	13	13	6
Osteossarcoma	19	18	10	23	16	27	21	26	14	17	13	20
Ewing	15	5	12	7	4	21	14	9	8	10	16	9
TCG	7	6	22	10	14	11	20	15	11	23	15	21
Wilms	4	6	9	9	11	12	13	10	10	7	8	7
SNC	37	34	40	41	51	50	55	64	37	52	64	39
Retinoblastoma	5	3	6	9	4	6	6	6	5	8	6	4
Cabeça e pescoço	5	13	5	8	6	8	8	7	4	8	8	4
Tumores raros	16	19	20	18	31	25	29	19	15	16	15	20
Outros	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0
LMMJ	0	2	10	5	3	8	9	5	5	6	7	2

Fonte: Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos, 2023.

SMD – Síndrome mielodisplásica; LLA – Leucemia Linfóide aguda; LMA – Leucemia mielóide aguda; LMC – Leucemia mielóide crônica; LH - Linfoma de Hodgkin; LNH – Linfoma não-Hodgkin; TCG – Tumores de células germinativas; SNC – Sistema nervoso central; LMMJ – Leucemia mielomonocítica juvenil. SMD: Síndrome Mielodisplásica.

1.1 Tumores de células germinativas (TCGs)

Os tumores de células germinativas (TCGs), podem ser classificados em gonodais (ovário e testículos) e extragonodais (SNC, mediastinais, sacrococcígeos e retroperitoneais, entre outros mais raramente encontrados em locais como vulva, vagina, estômago e retrofaringe) (Figura 1). Os TCGs têm origem durante a embriogênese, especificamente a partir da quarta semana, quando as células germinativas primordiais (CGPs) migram do saco vitelino em direção à parede posterior do intestino primitivo até a crista genital. Entretanto, por razões ainda desconhecidas, se as CGPs não completarem a migração seguindo caminhos alternativos, estas poderão dar origem a tumores em áreas extragonadais¹.

Os TCGs representam aproximadamente 3,3% dos tumores malignos em crianças e adolescentes <15 anos. Além disso, apresentam distribuição bimodal, tendo dois picos^{5, 6}. O primeiro pico ocorre até dois anos de idade, com o aparecimento de alterações nas células que formam o organismo com maior frequência para os tumores extragonodais

(sacroccígeo, retroperitoneal, mediastino e SNC), sendo o tumor sacroccígeo com maior número de casos em menores de um ano e com maior frequência em meninas^{1, 7-9}. O segundo pico ocorre na adolescência, entre 15-18 anos, que corresponde a 14% dos tumores malignos nessa faixa etária, no qual existe a ação de estímulos hormonais que podem contribuir para o desenvolvimento dos tumores gonodais com maior frequência^{1, 5, 7, 10}. A Figura 1 representa os TCGs mais frequentes em crianças e adolescentes.

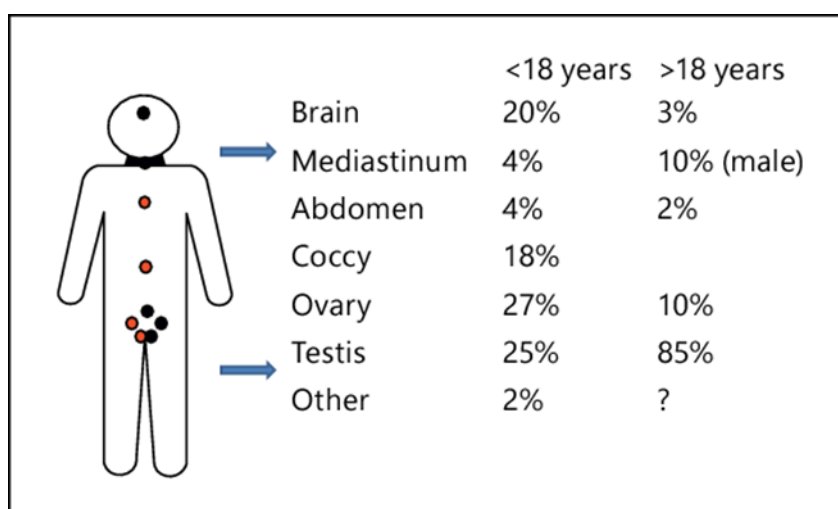


Figura 1- Representação dos locais primários dos TCGs de acordo com faixa etária. Incluindo a incidência em menores de 18 anos: cérebro 20%, mediastino 4%, abdômen 4%, cóccix 18%, ovário 27%, testículo 25% e outros 2%. Em maiores de 18 anos apresenta as incidências: cérebro 3%, mediastino 10%, abdômen 2%, cóccix sem evidências, ovário 10%, testículo 85%¹¹.

1.1.1 Classificação dos tumores de células germinativas

Devido à natureza heterogênea desses tumores, várias classificações foram propostas com o intuito de compreender, direcionar e padronizar a abordagem aos pacientes, sendo as principais classificações feitas de acordo com a histologia, podendo usar a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) e a subclassificação proposta pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas dos Estados Unidos (AFIP)¹. Outra maneira de classificar os TCGs é pela sua localização, seguindo os critérios estabelecidos pela *Children's Oncology Group* (COG) para tumores de ovário.

Os tumores gonodais são chamados de germinomas, sendo que no testículo recebem o nome de seminoma e no ovário disgerminoma. Os tumores extragonodais incluem os tumores de seio endodérmico, coriocarcinoma, carcinoma embrionário, tumores mistos e

teratomas (maturo, imaturo e combinado)^{5-7, 10}.

A diversidade presente na classificação histológica dos tumores de células germinativas é justificada pela origem totipotente das células germinativas primordiais. A exemplificação da tumorigênese proposta na Figura 2 mostra que os germinomas são pluripotentes e surgem de células germinativas primordiais indiferenciadas^{6, 12}. Os tumores com alterações embrionárias e somáticas exibem diferenciação embrionária precoce e podem se diferenciar em tumores contendo todos os folhetos embrionários: endoderme, ectoderme e mesoderme, podendo originar os carcinomas embrionários e teratomas, respectivamente^{3, 4, 12, 13}. Os tumores com característica totipotente com origem das células germinativas primordiais que seguem diferenciações extraembrionárias podem resultar em tumores do saco vitelino e coriocarcinoma. Os tumores que contêm combinações de histologia são os TCGs mistos¹.

1.1.2 Diagnóstico e tratamento dos tumores de células germinativas

Os TCG são caracterizados por distintos achados clínicos e histológicos que influenciam o prognóstico. Devido à heterogeneidade dos TCGs, é necessário implementar critérios de avaliação tumoral e correlacioná-los¹⁴. Como critérios gerais, são usados a idade do paciente no momento do diagnóstico, o sítio primário do tumor, histologia, os níveis dos marcadores tumorais, principalmente Gonadotrofina Coriônica Fração β (Beta hCG), Alfa Fetoproteína (AFP), e Lactato desidrogenase (DHL)¹. Nos TCGs intracranianos, há a possibilidade de avaliar os níveis de fosfatase alcalina na placenta como marcador tumoral, auxiliando na compreensão da diversidade do tumor e do microambiente tumoral, além de facilitar o diagnóstico precoce. Esses marcadores tendem a se normalizarem após a cirurgia¹⁵. Portanto, para o diagnóstico, é importante avaliar os marcadores biológicos Beta hCG, AFP e DHL^{1, 7}, bem como os dados clínicos dos pacientes, análises histopatológicas e os exames de imagem.

Por se tratar de tumores com características diferentes, nas últimas três décadas foram criados, remodelados e adaptados quatro protocolos brasileiros para o tratamento dos TCGs pediátricos, sendo primeiro o protocolo TCG-91¹⁶, seguido do protocolo-99¹⁷, protocolo-2008¹⁸ e TCG-GALOP-2017¹. Os protocolos objetivam padronizar, uniformizar e aumentar a efetividade das terapias¹ e foram realizados pela equipe do Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos com informações de pacientes cadastrados pelo grupo Brasileiro-TCG da

infância. Em umavisão geral, são levados em consideração o sítio primário (ovário, testículo, vulva, vagina, estômago, sacrococcígeos, retroperitoneais, mediastinais e SNC), estadiamento do tumor, escolha e duração do tratamento, a necessidade de associação das terapias, sobrevida global e livre de doença, chance de remissão completa, uso de marcadores tumorais e estratificação de risco^{1, 7}.

A maioria dos TCGs são sensíveis à quimioterapia, sendo a cisplatina o agente mais efetivo no tratamento. Diversos autores afirmam que os tratamentos quimioterápicos à base de cisplatina correspondem ao grande avanço no tratamento dos TCGs¹⁹. A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina-II ou CDDP) é um análogo de platina e sua atividade citotóxica consiste na intercalação entre os pares de bases nitrogenadas, formando ligações cruzadas da CDDP com o DNA através dos átomos de platina, gerando os adutos ciplastina-DNA que impedem a progressão do ciclo celular^{20, 21}. Entretanto, um desafio ainda vigente no tratamento com cisplatina é a resistência de alguns pacientes a esse composto. Os mecanismos moleculares que levam um paciente ser resistente a um determinado quimioterápico ainda não foram totalmente elucidados, mas é sabido que a transição epitélio-mesenquimal (EMT) apresenta alto grau de importância nesse contexto²²⁻²⁴.

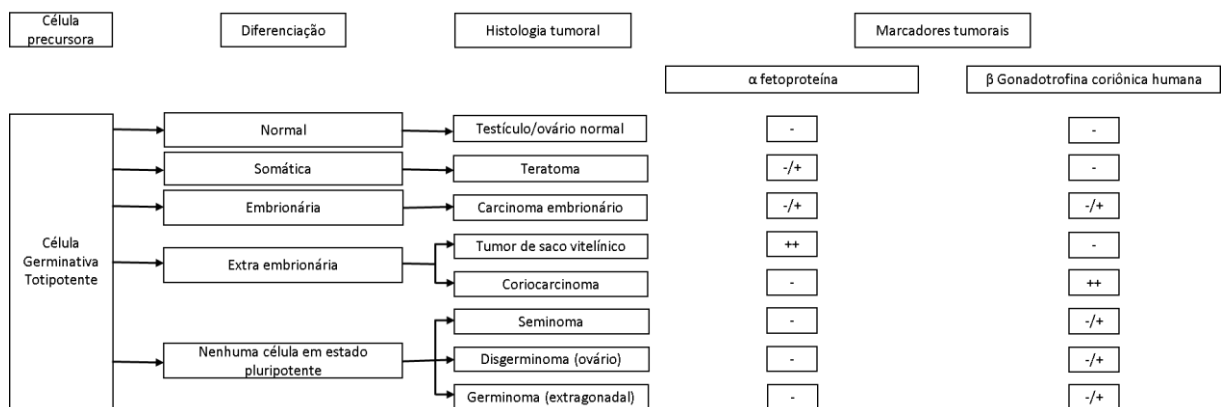


Figura 2- Representação dos tipos histológicos dos TCGs de acordo com a tumorigênese, célula precursora, via de diferenciação e os principais marcadores, Gonadotrofina Coriônica Fração β (Beta hCG) e Alfa Fetoproteína (AFP). Fonte: Adaptado e traduzido de F Shaikh 2016⁶.

1.2 Transição epitélio-mesenquimal (EMT)

A transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *Epithelial-mesenchymal transition*) é um processo que apresenta um conjunto de alterações moleculares e morfológicas, e marcadores, nos quais as características de células epiteliais são reprimidas e essas adquirem propriedades mesenquimais, possuindo assim fenótipo de malignidade, tendo características

marcantes de invasão, migração e disseminação celular (Figura 3)²⁵⁻²⁷.

No cenário histórico, em 1968, Elizabeth Hay participou do 18º Simpósio Hahnemann em Baltimore, descrevendo o que atualmente conhecemos como EMT do tipo 1²⁸⁻³⁰. Esse processo envolve a migração de células epiteliais na crista neural para a formação do tubo neural, embora ela não tenha utilizado o termo EMT na época. Em 1970, outros grupos de pesquisa, como o da Universidade de Hamburgo na Alemanha e o *Nagaoka Red Cross Hospital* no Japão observaram a coexistência de células epiteliais e mesenquimais no mesmo tumor. Em 1981, Dulbecco et al. descreveram a transição de células cuboides para fusiformes³¹. Nesse estudo, células mamárias foram induzidas à transição, assumindo características fusiformes. Foi apenas em 1982 que Elizabeth Hay, pioneira nos estudos de EMT, publicou a primeira descrição do processo de indução da EMT em células adultas, utilizando o termo "transformação epitelial-mesenquimal" ao relatar sobre a EMT³². No mesmo ano, um grupo de pesquisa da Universidade de Genebra, Suíça, demonstrou que células epiteliais durante a embriogênese perdiam proteínas de ancoragem e transmembranas, como os desmossomos e citoqueratinas, e adquiriam filamentos de vimentina, embora não tenham utilizado o termo EMT, descreveram como uma mudança rápida de caráter epitelial para mesenquimal.

A partir de 1986, o grupo de pesquisa de Elizabeth Hay concentrou-se no estudo das características morfológicas, especialmente no citoesqueleto das células que passam pela EMT²⁹. Em 1990, a principal via de sinalização envolvida na EMT foi descrita, a via TGF- β (fator de crescimento transformador beta). Em 1991, Potts et al. demonstraram o impacto do TGF- β 3 nas células endoteliais cardíacas induzidas à EMT³³. Em 2001, o Laboratório do Instituto Ludwig para Pesquisa do Câncer de Uppsala relacionou a ativação da via de sinalização TGF- β com o aumento da expressão de SMAD^{34, 35}. A partir de então, houve aumento nas pesquisas relacionadas à EMT e, consequentemente, no número de artigos publicados a cada ano, principalmente relacionados ao câncer.

Conforme descrito anteriormente, inicialmente a EMT foi relatada como a transformação epitelial-mesenquimal, na qual as células poderiam estar somente em dois estados: com o fenótipo epitelial ou fenótipo mesenquimal^{26, 32, 36}. No entanto, estudos expandiram essa compreensão, revelando a existência de células com perfis intermediários ou híbridos que passam pela EMT³⁷. Nesses casos, as células exibem, simultaneamente, características epiteliais e mesenquimais. Atualmente, é compreendido que algumas células

do microambiente tumoral não irão completar a EMT, ou seja, o fenótipo totalmente mesenquimal talvez não seja alcançado³⁸⁻⁴¹.

1.2.1 Células epiteliais e mesenquimais

As células epiteliais são estreitamente ligadas entre si (justapostas), possuindo pouca matriz extracelular. Diversos componentes corroboram as características desse tipo celular, a saber: junções de oclusão, junções aderentes, desmossomos e junções de comunicação, as quais caracterizam as junções célula-célula. Essas junções ajudam a manter a integridade estrutural e funcional, segurando-as firmemente e impedindo o deslocamento de uma célula individual^{27, 42, 43}. Essas interações célula-célula envolvem fortes junções do tipo E-caderina e desmossomos, e interações célula-matriz extracelular mediadas por integrinas, e outras moléculas que conferem uma polaridade à célula epitelial, com diferentes funções para as superfícies basal e apical^{41, 44}.

A polaridade, característica das células epiteliais, é determinada pela presença das junções oclusivas. Essas junções desempenham um papel crucial na organização das células epiteliais, estabelecendo claramente duas regiões distintas: a porção apical, em contato com a superfície, e a camada basal, adjacente à lâmina basal do tecido conjuntivo subjacente. A função primordial dessas junções é criar uma barreira eficaz entre as células, controlando seletivamente a passagem de moléculas e íons por meio da comunicação intercelular⁴¹. Essa barreira desempenha um papel vital na manutenção da polaridade celular, impedindo a entrada desordenada de substâncias. Além disso, as junções aderentes também desempenham um papel fundamental ao assegurar a conexão sólida célula-célula^{41, 45}.

A junção aderente desempenha um papel importante em diversos processos celulares, incluindo a adesão entre células adjacentes, estabelecendo conexões firmes e coesas que as mantêm unidas. Essa junção é mediada pela proteína transmembranar E-caderina, que desempenha um papel crucial na formação das ligações intercelulares. A E-caderina estabelece conexões fortes entre as células, proporcionando uma adesão celular robusta^{45, 46}. Além disso, essa proteína está fortemente associada aos filamentos de actina intracelular, o que proporciona suporte e sustentação ao conjunto de células, evitando o deslocamento de células individuais⁴⁷.

A junção aderente e a E-caderina são componentes essenciais para a adesão e coesão

celular, desempenhando um papel vital na manutenção da estrutura e integridade dos tecidos²⁷. Os desmossomos são proteínas em forma de disco e auxiliam a ancoragem célula-célula, promovendo a adesão intracelular através da interação entre as proteínas, desmogleínas e desmocollinas que constituem os desmossomos. Essas proteínas estão ligadas aos filamentos intermediários através de ligações, as quais permitem que as células permaneçam aderidas e estáveis umas às outras. Outra junção de extrema importância para as células epiteliais são as junções *gap*, que são constituídas por proteínas conhecidas como conexinas⁴⁷.

As conexinas desempenham um papel crucial ao facilitar a passagem de íons, moléculas pequenas e sinais elétricos^{48, 49}. Esse processo é um fator chave na preservação da polaridade celular. A principal função dessas junções *gap* é permitir a comunicação direta entre células e a resposta coordenada a estímulos simultâneos⁵⁰. Logo, as características genótípicas das células epiteliais incluem a expressão dos marcadores E-Caderina, desmoplaquina, citoqueratinas, claudinas e ocludinas.

Diferente das células epiteliais, as células mesenquimais possuem poucas interações célula-célula e redução da polaridade apical-basal^{45, 51, 52}. Essas células interagem com os componentes da matriz extracelular através das integrinas nas junções de adesão focal, permitindo o movimento da célula. Além dessa característica, possuem citoplasma rico em filamentos de vimentina (marcador de origem mesodérmica) e formam estruturas irregulares com alta capacidade de migração. Outros marcadores expressos incluem a N-caderina, alfa-actina do músculo liso (α -SMA), proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1), fibronectina (FN1), colágeno tipo I (COL1A1) e metaloproteinases (MMP) (Figura 3)^{51, 53, 54}.

Durante a EMT, as células epiteliais perdem a polaridade celular por regular negativamente a expressão de citoqueratinas e moléculas de adesão, tais como E-caderina. Concomitantemente à diminuição dos marcadores epiteliais, a expressão dos marcadores de células mesenquimais é aumentada, incluindo alfa-actina do músculo liso (α -SMA), proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1), vimentina (VIM), N-caderina, fibronectina, colágeno tipo I e metaloproteinases (MMP). As células epiteliais que possuem morfologia poliédrica passam a apresentar morfologia fibroblastóide^{37, 39, 41, 48, 55}. Ademais, o estabelecimento do fenótipo mesenquimal é enfatizado pelo aumento da capacidade migratória e invasiva, resistência a apoptose e aumento da produção de componentes da matriz extracelular⁴⁴.

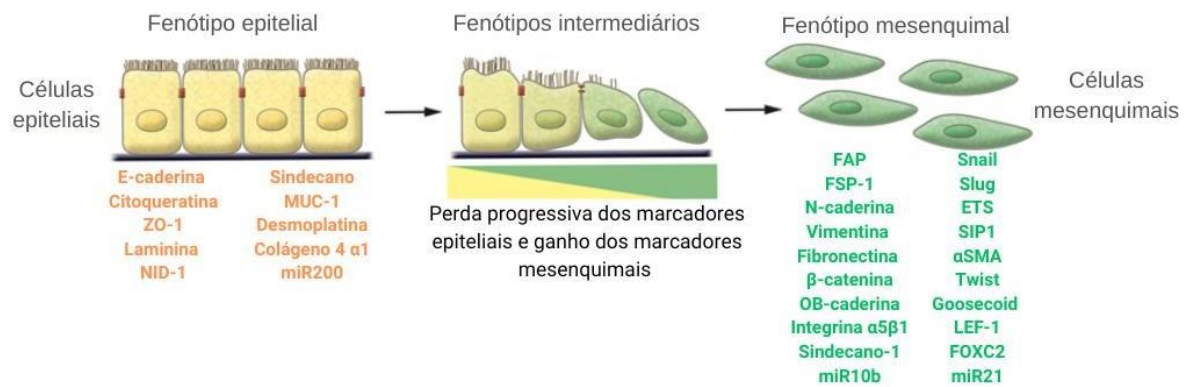


Figura 3- Representação do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT). Fonte: Adaptado de Kalluri & Weinberg, 2009^{25,26}.

1.2.2 Tipos de EMT

A EMT pode ser classificada em três tipos (Figura 4)^{25, 26, 56}. A EMT do tipo 1 está relacionada com diversos processos fisiológicos, especialmente na embriogênese, estando intimamente ligada à migração e diferenciação das células que formam os folhetos germinativos: ectoderma, mesoderma e endoderma. Esses folhetos germinativos são a origem da formação diversificada de tecidos e órgãos ao longo do desenvolvimento embrionário. A EMT do tipo 1 difere notavelmente dos outros tipos, pois não apresenta fenótipo agressivo e invasivo. Pelo contrário, está fortemente associada a processos fisiológicos cruciais^{25, 27}. Além das funções já mencionadas, formação dos órgãos e tecidos, a EMT do tipo 1 também está envolvida na formação da placenta, migração e invasão do endométrio para a implantação do embrião. Ademais, a EMT tipo 1 desempenha papel na geração dos melanócitos derivados das cristas neurais, sendo importante na pigmentação da pele e de outros tecidos^{25, 26, 31, 57}.

A EMT tipo 2 promove importante participação na regeneração tecidual e na ocorrência de fibrose, incluindo casos como fibrose renal e pulmonar. Esse tipo de EMT pode ser categorizado em dois processos: fisiológico (regeneração tecidual) e patológico (fibrose persistente). A fase fisiológica se inicia com a mobilização predominante de fibroblastos, os quais são importantes para a regeneração dos tecidos após traumas e/ou lesões inflamatórias. A etapa de regeneração está ligada com a resposta inflamatória e esse processo, em situações não patológicas, cessa conforme a inflamação é contida, como normalmente ocorre em cicatrização de feridas e regeneração de tecidos^{58, 59}.

No entanto, quando o processo inflamatório persiste e se torna crônico, a EMT do tipo 2 fisiológica pode evoluir para o tipo patológico^{31, 59, 60}. Isso frequentemente desencadeia a

fibrose persistente nos tecidos e resulta na degradação do órgão afetado, como pode acontecer no rim, pulmão, fígado e outros. A fibrose persistente pode ser mediada por células inflamatórias e fibroblastos, que liberam diversos sinais inflamatórios⁵⁹. Além disso, essa fase é composta por uma matriz extracelular rica em colágeno, lamininas e elastina. Marcadores como a Vimentina têm sido alvos moleculares para identificar indícios de inflamação persistente que pode progredir para um estado crônico, estabelecendo assim uma relação com a EMT do tipo 2⁵⁸⁻⁶⁰.

No mecanismo de invasão e migração celular, ocorre a diferenciação das células epiteliais, sendo que marcadores epiteliais como E-caderina, EPCAM e citoqueratinas podem ser suprimidos por marcadores mesenquimais como SNAIL, SLUG, VIM e N-caderina⁶¹⁻⁶⁵. Isso resulta no aumento da plasticidade celular, levando à perda da polaridade, ruptura da barreira da membrana basal e disseminação para a corrente sanguínea⁶⁶.

As células podem migrar individualmente ou em grupos, colonizando órgãos adjacentes ou distantes do tumor primário, potencialmente levando à disseminação metastática. A aquisição do fenótipo agressivo e invasivo é fortemente influenciada pela expressão de marcadores mesenquimais, como α -SMA, FSP1, VIM e Desmina⁴¹⁻⁴³. Essa mudança resulta na diminuição da aderência celular, reorganização do citoesqueleto para maior mobilidade e liberação de enzimas degradantes da matriz extracelular (MMPs). Outro tipo é a EMT do tipo 3 que está intimamente ligada à progressão do câncer, tornando importante o desenvolvimento de estudos que correlacionem a EMT e a disseminação tumoral^{26, 41}. Esses estudos podem proporcionar uma compreensão dos mecanismos moleculares que influenciam as vias de sinalização relacionadas com a ativação ou inibição da EMT^{38, 67-69}. Essa compreensão poderia levar a novas estratégias terapêuticas. Além disso, a identificação de marcadores específicos associados à EMT é necessária para entender o potencial do tumor metastatizar, associar com a sobrevida e para o direcionamento de terapias mais específicas e direcionadas para pacientes oncológicos.

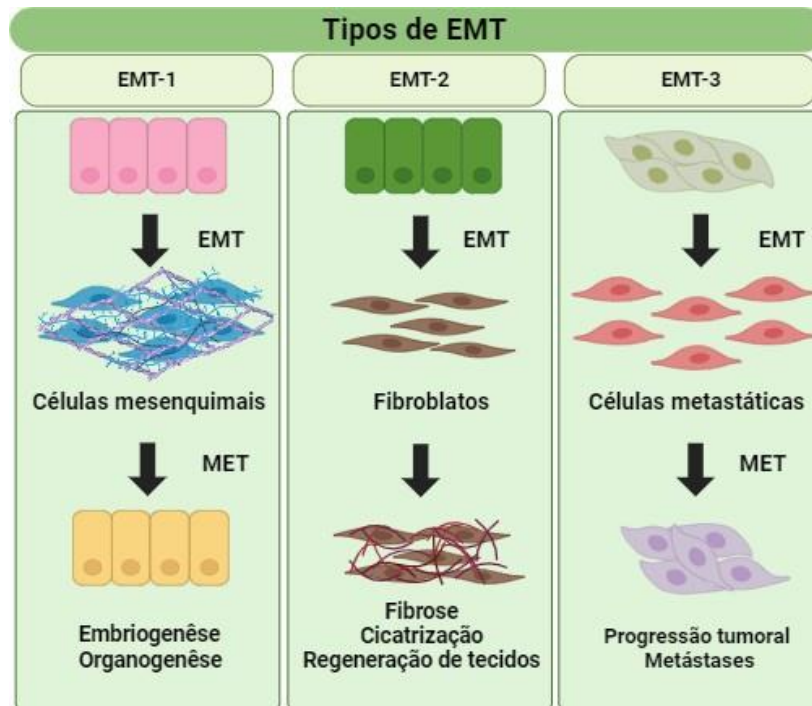


Figura 4- Representação dos tipos de EMT (EMT-1, EMT-2 e EMT-3) e suas respectivas influências sobre a diferenciação das células. Fonte: Adaptado de Marconi, 2021⁵⁶.

1.2.3 Fatores de transcrição relacionados à EMT

Diferentes sinais e estímulos provenientes do microambiente tumoral podem ativar o processo da EMT, incluindo os fatores de crescimento, fatores de transcrição, hipóxia, citocinas, entre outros. Estudos demonstraram que alguns fatores de transcrição tais como *SNAIL*, *SLUG*, *TWIST1*, *ZEB1*, *ZEB2*, *FOXC2*, *KLF8* e *TCF3* apresentam um papel crítico na EMT^{30,38,39}. Uma vez que esses fatores são ativados, ocorre a inibição da transcrição dos genes considerados marcadores epiteliais, como a *CDH1*, *COL5A2*, *MUC-1* e *COL3A1*, resultando na perda das junções célula-célula e no ganho da capacidade migratória e invasiva^{56, 64, 70, 71}.

O papel do *SNAIL* e *SLUG* na EMT foi demonstrado em diversos tipos tumorais, incluindo melanoma^{64, 72, 73}, câncer de tireoide anaplásico⁷⁴, adenocarcinoma de ovário^{75, 76}, câncer de bexiga⁷⁷, câncer colorretal^{78, 79} e câncer de pulmão de não pequenas células^{80, 81}. Haslehurst et al. (2012) avaliaram o papel dos genes relacionados com a EMT na resistência à cisplatina em adenocarcinoma de ovário²². A análise proteômica mostrou um aumento de *SNAIL* e *SLUG*, bem como do marcador mesenquimal *VIM*, e uma regulação negativa de E-caderina, sugerindo que esses genes podem atuar como biomarcadores da resistência à quimioterapia²².

1.2.4 Fatores de transcrição *SNAIL* e *SLUG*

Os fatores de transcrição *SNAIL* e *SLUG* desempenham funções importantes na regulação da expressão gênica (Figura 5). *SNAIL* encontra-se localizado no cromossomo 20, enquanto o *SLUG* está situado no cromossomo 8⁶³. Ambos os fatores apresentam *zinc finger* (ZF) em suas estruturas de ligação, que confere a capacidade de ligação aos promotores de marcadores epiteliais, o exemplo dessa ligação ocorre no gene E-caderina (*CDH1*)^{41,65}. Quando esses fatores de transcrição se associam aos promotores do gene *CDH1*, ocorre a repressão da expressão da proteína E-caderina, demonstrando a importância de *SNAIL* e *SLUG* na indução da EMT e, consequentemente, na tumorigênese^{62,63}. A presença de *SNAIL* e *SLUG* está profundamente ligada ao processo de progressão tumoral. Isso se deve à capacidade desses fatores de transcrição em regular a expressão de genes que controlam características tanto epiteliais quanto mesenquimais⁶³. Ao suprimir a expressão da *CDH1*, como mencionado anteriormente, e estimular a expressão de *VIM*, esses fatores contribuem para a aquisição de características mesenquimais a células anteriormente com fenótipo epitelial⁶⁵. Esse processo, por sua vez, está correlacionado com o aumento da invasão e migração celular^{64,71,81}.

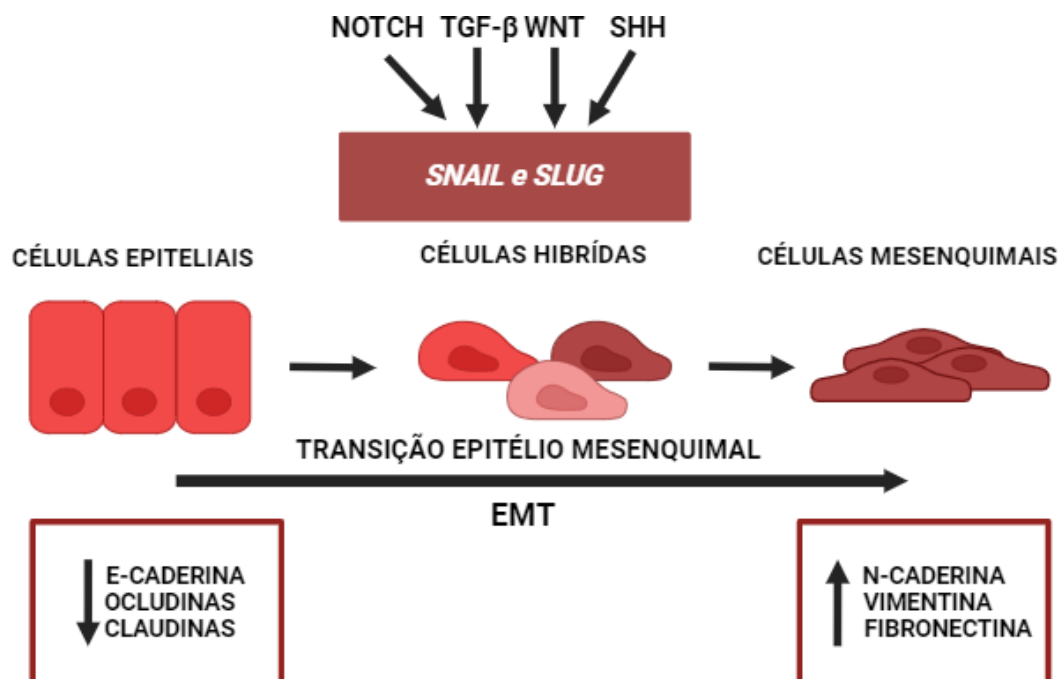


Figura 5- Papel de *SNAIL* e *SLUG* na transição epitelial-mesenquimal. O esquema mostra as vias gerais de sinalização que regulam o *SNAIL* e *SLUG* e alguma das moléculas conhecidas por ser afetadas por esses fatores de transcrição²⁶. Fonte: Criado com BioRender.com.

1.2.5 Vias de sinalização e alvos terapêuticos

A expressão e ativação dos fatores de transcrição indutores da EMT ocorrem em resposta a várias vias de sinalização (Figura 6), incluindo aquelas mediadas pelo TGF- β , proteína morfogenética óssea (BMP), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), sinalização WNT, *Sonic Hedgehog* (SHH), NOTCH e integrina^{22, 52, 63, 64, 69}. Essas vias sinalizam através de cascatas de quinase intracelular para induzir fatores de transcrição que ativam a expressão de genes associados a EMT. Vale destacar que as principais vias de sinalização estudadas em EMT são NOTCH, WNT e TGF- β . O papel da via NOTCH na EMT induzida por TGF- β 1 foi avaliado em linhagem celular de câncer de pulmão e demonstraram que a ativação de NOTCH promoveu a EMT induzida por TGF- β 1 através da modulação direta da expressão de SNAIL (Figura 6)^{55, 74, 82, 83}. Ainda, foi evidenciado que a inibição da via NOTCH leva à reversão parcial da EMT pela diminuição das expressões de SNAIL, SLUG, ZEB1, VIM e fator nuclear kappaB em câncer de pâncreas, mostrando que SLUG é essencial para a EMT mediada por NOTCH^{55, 68, 84, 85}. Estas descobertas associam fortemente a via NOTCH aos fatores de transcrição SNAIL/SLUG em câncer, tornando-os alvos atraentes para novas terapias.

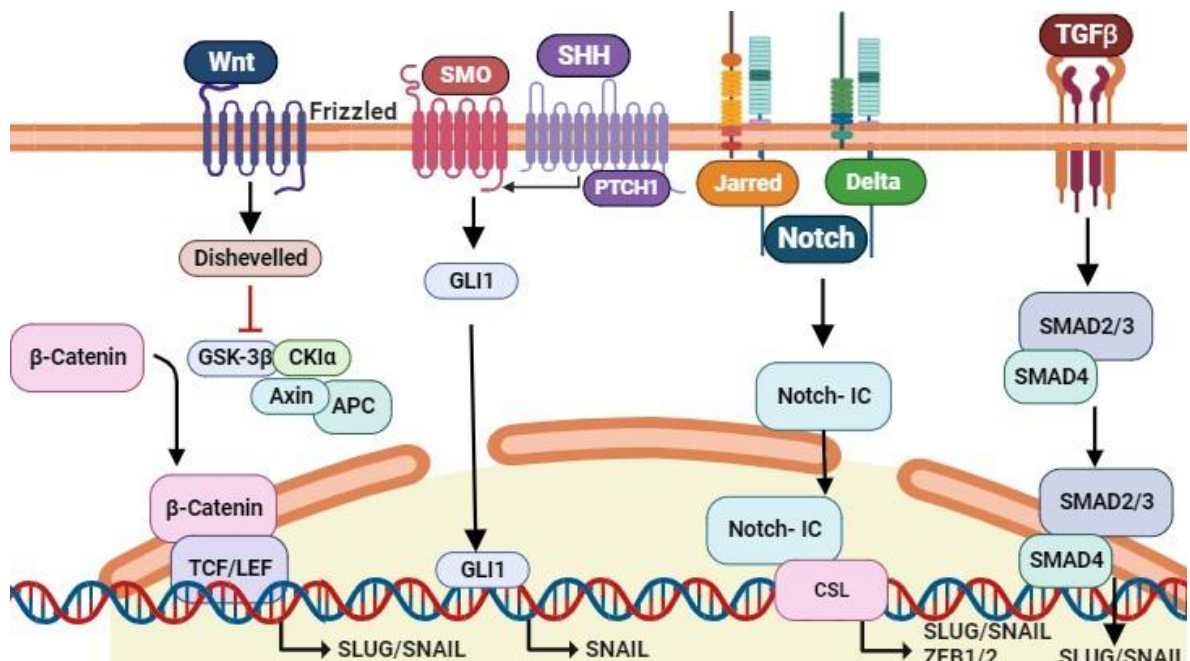


Figura 6- Representação das vias de sinalização indutoras da transição epitélio-mesenquimal (EMT). Fonte: Criado com BioRender.com.

A ativação desregulada da EMT está envolvida em diversos mecanismos relacionados com a progressão tumoral. Para desencadear a EMT, diferentes vias de sinalização são estimuladas, promovendo a transcrição e ativação dos fatores envolvidos com esse processo⁴⁶, resultando no aumento do potencial de plasticidade, migração e invasão das células tumorais. Como consequência direta, as células tumorais adquirem características que facilitam sua disseminação, contribuindo assim para a evolução do tumor^{26, 27, 52, 53, 67}.

Devido ao impacto da EMT em diversas etapas da progressão tumoral, os mecanismos relacionados à sua ativação e funcionalidade estão sendo estudados para identificar possíveis alvos moleculares farmacológicos^{53, 69, 86}. O objetivo é diminuir as características malignas, como potencial de invasão e migração das células tumorais epiteliais que passam pelo processo da EMT, restringindo as células tumorais ao seu sítio primário^{39, 71, 81}. Isso, por sua vez, poderia facilitar intervenções cirúrgicas ou tratamentos quimioterápicos, visando a remoção e eliminação do tumor.

É importante ressaltar que a eficácia do bloqueio da disseminação das células tumorais é mais provável em tumores em estágios iniciais sem metástases. Para tumores em estágio mais avançados, a terapia anti-EMT pode impedir a colonização dos órgãos já afetado pelas metástases, contribuindo para a redução da quantidade de células-tronco tumorais (CSCs) e, por consequência, diminuir a presença de células tumorais circulantes (CTCs)⁸⁷.

Além disso, as terapias direcionadas à EMT podem ter um impacto na expressão de transportadores ABC, como a P-glicoproteína (P-gp ou MDR1), MRP (*Multidrug Resistance-Associated Protein*) e CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), os quais foram associados ao aumento do efluxo de drogas nas células tumorais^{53, 88, 89}. Ao inibir os transportadores ABC, pode ocorrer o aumento da sensibilidade dos tumores aos tratamentos quimioterápicos⁸⁹.

A via TFG- β pode exercer um efeito antitumoral em fases iniciais do crescimento de células tumorais e em algum momento seu efeito muda para a ativação de genes que contribuem para a progressão tumoral^{24, 90}. Contudo, o momento exato em que essa via modifica sua função não foi totalmente elucidado, demandando mais estudos para compreender esse processo de mudança de funcionalidade. Essa via de sinalização está envolvida com a regulação de diversos genes relacionados com a EMT, o que tem impulsionado os estudos com as terapias anti-EMT⁵³. Um exemplo notável de terapia direcionada à inibição da via TFG- β é o Galunisertib (LY2157299) (Figura 7)^{69, 86}.

O Galunisertib atua inibindo a via TGF- β através da fosforilação do *SMAD2/3*, impedindo, assim, a transcrição de genes envolvidos na progressão tumoral, incluindo *SNAIL* e *SLUG*⁶⁴. Yingling e McMillen (2018) demonstraram que células de adenocarcinoma ductal de pâncreas (KPC-M09) submetidas ao tratamento com TGF- β apresentaram uma redução na expressão de E-caderina⁸⁶. No entanto, após o tratamento com Galunisertib, houve um aumento significativo na expressão de E-caderina nas células tratadas anteriormente com TGF- β ⁸⁶. Esses resultados indicam a capacidade do Galunisertib de reverter os efeitos da EMT induzida por TGF- β , realçando o seu potencial como uma estratégia terapêutica promissora para inibir a progressão tumoral e melhorar os desfechos clínicos em pacientes oncológicos.

A ativação da via WNT desempenha um papel crucial ao bloquear a fosforilação da beta-catenina pela via GSK3B. Isso permite que a beta-catenina se acumule no citoplasma e, em seguida, migre para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição como *TCF* e *LEF*⁷⁹. Esses fatores regulam a transcrição dos genes responsáveis pela proliferação, migração e invasão celular⁹¹. A via WNT é importante para a ativação da EMT no contexto tumoral, logo várias terapias estão em fase de testes pré-clínicos e clínicos voltadas para essa via. Uma dessas abordagens está direcionada à enzima PORCN⁹², a qual é responsável por adicionar grupos de ácido palmítico às proteínas envolvidas na via WNT, auxiliando na ativação dessa via e desencadeando a expressão dos genes associados à migração e invasão tumoral.

Devido a função da enzima PORCN sobre a via WNT, vários compostos estão sendo avaliados e testados em estudos pré-clínicos e clínicos⁹². Entre eles, o WNT974 (*GK974*) está sendo aplicado em pacientes com diferentes tipos tumorais, principalmente tumores sólidos (Figura 7). O mecanismo de ação do WNT974 consiste na adição, também, de ácido palmítico às proteínas envolvidas na cascata de ativação da via WNT, resultando na interferência da sinalização, interrupção do crescimento celular e inibição da transcrição dos genes relacionados à EMT^{93, 94}. Esse composto tem mostrado ser um grande potencial para modular a via WNT e atingir genes e mecanismos-chaves envolvidos na EMT e, consequentemente, na progressão tumoral, oferecendo a possibilidade de terapias alvo para diversos tipos de câncer^{79, 91-94}.

A via de sinalização NOTCH também é responsável pela regulação da EMT. O processo de ativação da via NOTCH envolve a interação dos ligantes Delta e *Jagged* aos receptores NOTCH^{38, 55, 68, 84}. Isso desencadeia a clivagem do receptor, liberando a porção intracelular (*NICD*), que migra para o núcleo e se liga ao fator de transcrição *CSL*, formando o complexo

*NICD-CSL*⁵⁵. Essa interação auxilia na ativação da transcrição de genes relacionados com a EMT.

A via NOTCH apresenta diversos efeitos e mecanismos associados ao crescimento de células tumorais, angiogênese, aumento de metástases, regulação dos fatores de transcrição relacionados a EMT (EMT-TFs) e outros processos de desenvolvimento tumoral^{55, 65, 68, 84, 85, 93}. O surgimento desses mecanismos tumorais está totalmente integrado e ligado ao contexto celular. Como mencionado anteriormente, dada a relevância da via de sinalização, estudos clínicos e pré-clínicos estão em processos para avaliar as possíveis modulações na sinalizaçãodessa via.

Wan-Ching e Fischer (2015) demonstraram o potencial de *OMP-59R9* (Tarextumab) para inativar a via NOTCH, direcionando o bloqueio aos receptores NOTCH2/3 em tumores de mama, ovários, pâncreas e modelos de xenoinxertos de câncer de pulmão de não pequenas células (Figura 7). Esse estudo também revelou que a combinação de Tarextumab com quimioterápicos como gemcitabina e paclitaxel inibe seletivamente o crescimento tumoral⁶⁸. Esses resultados evidenciam a importância das terapias anti-EMT na redução da progressão de células tumorais, sendo relevante a realização de estudos para aprimorar a inibição seletiva de alvos que participam das vias de sinalização supracitadas, uma vez que estas também desempenham papéis fundamentais em outros processos biológicos, como o desenvolvimento de órgãos e cicatrização de feridas. Deve-se levar em conta que quando uma via é inibida, a EMT pode ser ativada pelas outras, sendo necessários mais estudos para entender esse mecanismo de compensação de via de sinalização/ativação da EMT^{47, 85, 95, 96}.

Os dados atuais fornecem resultados promissores para o desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos na área de inibidores de vias de sinalização^{69, 86}. Outra estratégia de terapia é a inibição direta dos EMT-TFs. No contexto tumoral, a EMT é uma etapa fundamental para os mecanismos relacionados com a progressão tumoral como a resistência a quimioterápicos, formação de metástases, invasão e migração, como mencionado anteriormente.

A EMT é desencadeada através de vias de sinalização e quando uma ou mais dessas vias são inibidas na tentativa de bloquear a transcrição dos genes relacionados com a progressão tumoral, os ligantes e os indutores das vias adjacentes podem levar a ativação da cascata de sinalização e, conseqüentemente, ao aumento da transcrição dos genes relacionados com a EMT⁴⁷. Logo, estudos *in vitro* estão sendo desenvolvidos para a síntese de

compostos que agem diretamente na inibição desses fatores de transcrição.

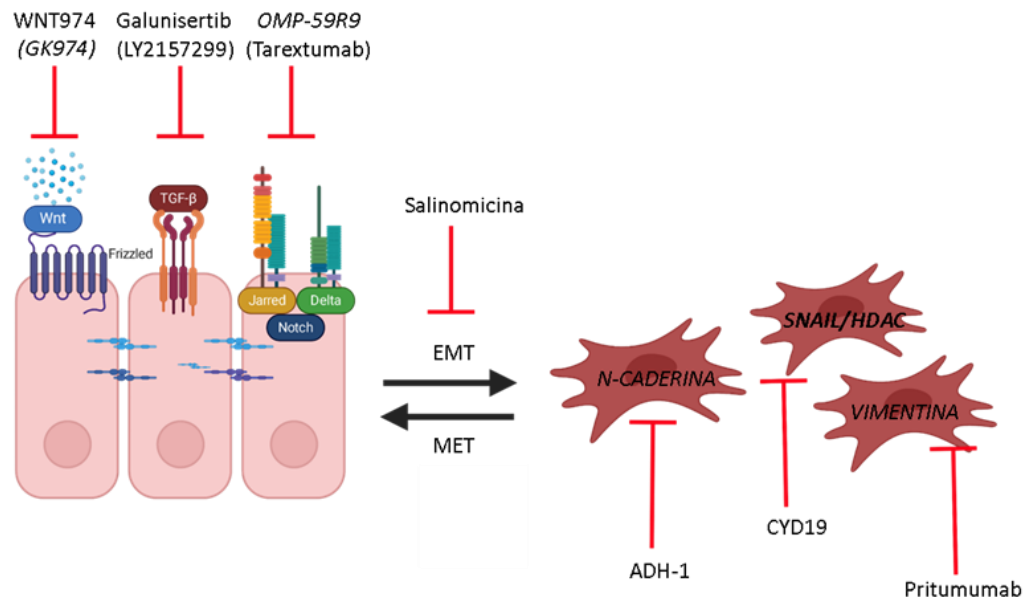


Figura 7- Alvos terapêuticos e inibidores da EMT. Existem três estratégias terapêuticas com fármacos em estudos clínicos e pré-clínicos para interferir no processo de EMT no tratamento tumoral, podendo assim reduzir o potencial metastático: i) Fármacos relacionados a inibição da ativação das vias de sinalização, WNT, TGF-beta e Notch; ii) inibição direta da EMT através de diversos mecanismos; iii) bloqueadores farmacológicos direcionados para a transcrição dos genes relacionados com a EMT.

1.2.6 Inibidores diretos dos fatores de transcrição

Dentre os principais fatores de transcrição relacionados a EMT, incluem *SNAIL* e *SLUG*, cuja alta expressão está correlacionada com mecanismos ligados a progressão tumoral, entre eles: i) agressividade tumoral, ii) formação de metástase, iii) menor sobrevida livre de progressão^{17,69,70}. Esses mecanismos e sua relação com a EMT já foram demonstrados em diversos tipos de tumores sólidos como: câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, câncer colorretal, câncer de próstata e câncer de pâncreas. Diversos estudos buscam descobrir terapias para a modulação dos fatores de transcrição e assim tentar diminuir a heterogeneidade tumoral, aumentando a possibilidade de resposta terapêutica para o paciente (Figura 8)^{53, 88, 89}.

Cui et al. (2022) demonstraram a inibição de *SNAIL* e histonas desacetilases (*HDAC*) em 59 linhagens celulares, representando nove tipos tumorais distintos⁹⁷. Essa inibição dupla resultou na diminuição da atividade proliferativa das células tumorais, principalmente na linhagem HCT-116 (tumor de colón). Em um estudo prévio, o mesmo grupo demonstrou que a inibição somente de *SNAIL* foi capaz de reduzir significativamente as células tumorais,

indicando boa resposta terapêutica para tumores sólidos⁷⁷.

Zhi et al. (2023) demonstraram que o composto *CYD19* levou a redução sinérgica e significativa da *SNAIL/HDAC*, modulando assim a expressão de *SNAIL* nas linhagens HCT-116 (tumor de colón), NCI-H522 (adenocarcinoma de pulmão), MDA-MB-435 e MCF-7 (ambos tumores de mama). A inibição da expressão de *SNAIL* aumentou a indução de apoptose celular. Além disso, quando esse composto foi aplicado em camundongos, houve redução significativa no crescimento tumoral, ultrapassando os 60%⁹⁸. Consequentemente, isso resultou na diminuição no surgimento e na formação de metástases.

O fator de transcrição *SLUG* está associado à migração e invasão de células tumorais^{22, 62, 63, 65, 73, 81}. Em tumores sólidos, como câncer de pulmão de não pequenas células e câncer de mama, o aumento da expressão de *SLUG* foi associado a menor sobrevida, maior tendência à formação de metástases, angiogênese, resistência à quimioterapia e radioterapia^{80, 81}. De forma geral, o *SLUG* desempenha o papel de promotor de metástases e supressor de genes epiteliais, principalmente E-caderina⁸⁰.

Devido à importância do *SLUG* em diversos mecanismos relacionados com a EMT, estudos clínicos e pré-clínicos têm surgido, com o objetivo de desenvolver terapias-alvo direcionadas a esse gene. Além disso, existe a possibilidade de associar essas terapias a outras drogas já disponíveis e utilizadas na prática clínica.

Cmero et al. (2021) demonstraram, através de um estudo aberto não randomizado de fase II neoadjuvante aplicado em pacientes com câncer de próstata, a relação da quantidade alélica de *SLUG* e a resposta ao tratamento proposto. Os pacientes foram tratados com bloqueadores de NR3C4, incluindo degarelix, abiraterona e bicalutamida⁹⁹. Os resultados desse estudo revelaram uma variedade de respostas ao tratamento proposto, sendo justificado devido a presente/ausência alélica de *SLUG*. Os resultados da avaliação de *SLUG* destacaram diferenças significativas nas respostas terapêuticas entre os participantes⁹⁹. Os pacientes que apresentaram perda de um alelo em grande parte das células avaliadas demonstraram resposta melhor quando submetidos a terapia proposta. Em contraste, aqueles que não apresentaram a perda alélica não responderam de maneira eficaz ou, em alguns casos, tiveram uma resposta menos favorável em comparação com o outro grupo⁹⁹.

Esses resultados mostram a importância do desenvolvimento de abordagens que visem inibir *SLUG*. Além disso, há um interesse em investigar possíveis sinergias ao combinar esses alvos terapêuticos com drogas já disponíveis e amplamente utilizadas na prática

farmacológica⁸⁹. Essa abordagem podem representar uma estratégia promissora no tratamento de tumores em que *SLUG* desempenha um papel central nas suas características agressivas e metastáticas. Ademais, podem aumentar as possibilidades de estratégias terapêuticas mais eficazes e personalizadas no contexto de tratamento tumoral alvo específico⁶⁵.

Embora inúmeros trabalhos demonstrem o papel da EMT em diferentes tipos de câncer, há uma escassez de informação a nível dos tumores de células germinativas.

2 JUSTIFICATIVA

Os fatores desencadeantes dos tumores pediátricos ainda não foram completamente esclarecidos. Dessa forma, estudos são realizados na tentativa de compreender não apenas a tumorigênese, mas também os mecanismos moleculares envolvidos na progressão tumoral. O papel da EMT é evidenciado na indução da migração e invasão tumoral, bem como a resistência a drogas^{24, 100-104}. É sabido que alguns fatores induzem a ocorrência da EMT, dentre eles destacam-se os fator de transcrição *SLUG*^{22, 73}. Esse fator é responsável por ativar vias de sinalização que vão auxiliar na perda dos marcadores epiteliais e ganho dos marcadores mesenquimais, capacidade de migração e invasão e resistência a apoptose e quimioterápicos.

Alguns genes associados a EMT, incluindo vimentina, E-caderina e N-caderina estão sendo usados como alvos terapêuticos em ensaios pré-clínicos e clínicos, incluindo em câncer de pulmão, mama e cabeça e pescoço^{69, 86}. Entretanto, apesar do aumento de estudos relacionando a EMT em diferentes tipos tumorais, ainda existe poucos trabalhos abordando os marcadores da EMT em TCGs, principalmente associados com a expressão de *SLUG*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

Avaliar o papel da expressão do fator de transcrição *SLUG* nos tumores de células germinativas.

3.2 Objetivos secundários

- Analisar, *in silico*, a expressão dos marcadores da EMT em pacientes adultos com TCG e associar aos dados clínico-patológicos;
- Realizar a inibição do fator de transcrição *SLUG* na linhagem celular de TCGs (1777N) através no sistema *shorthairpin RNA*;
- Determinar a expressão gênica e proteica do fator de transcrição *SLUG* e dos marcadores da EMT nas linhagens 1777N controle e com inibição de *SLUG* através das técnicas PCR em tempo real e *western blotting*, respectivamente;
- Avaliar a migração e invasão celular nas linhagens 1777N controle e com inibição de *SLUG*.
- Analisar o efeito do tratamento com cisplatina nas linhagens 1777N controle e com inibição de *SLUG* usando os métodos MTS, *XCELLigence* e imunofluorescência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia experimental foi realizada conforme a Figura 8.

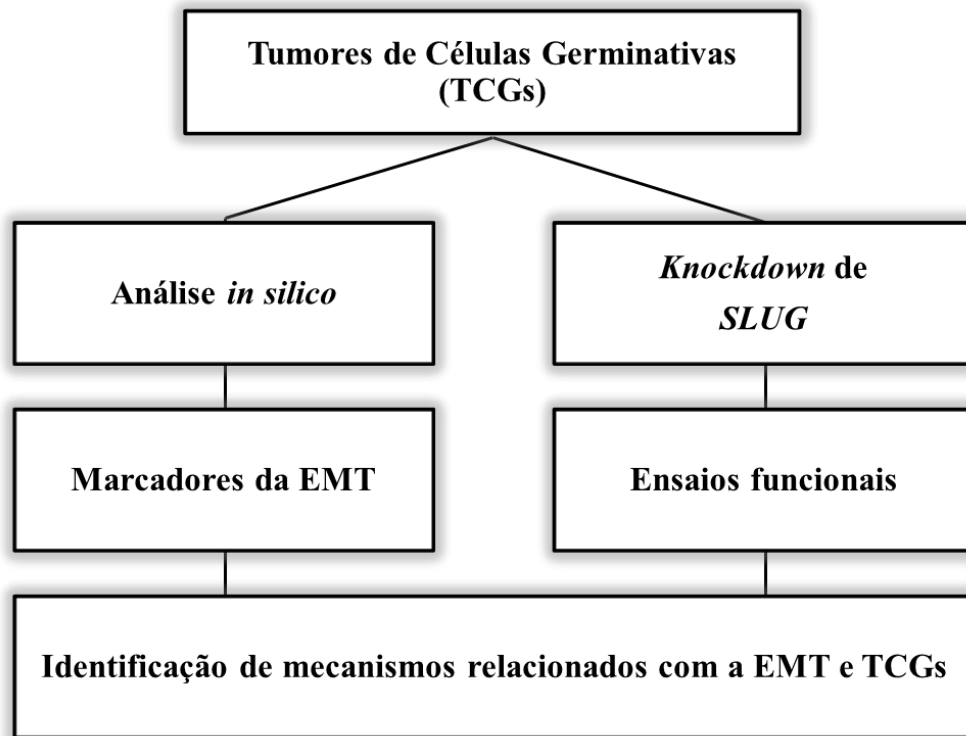


Figura 8- Fluxograma da estratégia experimental adotada no presente projeto.

4.1 *Análise in silico* dos marcadores da EMT em TCG

Nos últimos anos, diversos experimentos em larga escala foram realizados com a finalidade de gerar perfis de expressão gênica globais que caracterizam diversos tipos de câncer em populações heterogêneas, incluindo amostras de centros de pesquisas como: *Memorial Sloan Kettering Cancer Center, Children's Hospital of Philadelphia, University of Michigan-Dearborn, St Jude's Children's Research Hospital, University of California-Los Angeles, Baylor University*, Hospital de câncer de Barretos e outros centros. Além disso, consórcios também possuem os mesmos objetivos como: *International Cancer Genome Consortium* e *The Cancer Genome Atlas*, os quais os dados gerados foram reunidos e agrupados em bancos de dados. O Atlas do Genoma do Câncer (*The Cancer Genome Atlas* – TCGA, <https://cancergenome.nih.gov>) é uma ferramenta composta de características proteômicas, genômicas, epigenômicas, e transcriptômicas (pós-translacionais)¹⁰⁵, juntamente com dados e informações histopatológicas e clínicas, contribuindo assim para

análises clínicas e moleculares.

Dessa forma, o TCGA é capaz de criar *pipelines* de análise e processamento dos dados clínicos e biomoleculares com o intuito de acelerar o entendimento do câncer, podendo ser usadas essas informações para analisar alterações no DNA como fusões, alterações no número de cópias, aberrações na sequência de DNA, alterações epigenéticas, assinaturas de mutações, expressão gênica e proteica, levando a resultados que podem ser correlacionados com assinaturas dos diferentes tipos tumorais. Essas informações clínicas e moleculares geradas são encontrados em alguns bancos de dados como o cBioPortal.

O cBioPortal foi idealizado e criado pela equipe do centro de pesquisa *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSK). É um banco de dados de livre acesso (<https://www.cbioportal.org/>) e está disponível com a autorização e supervisão via GitHub e tem como rede de organização e programação uma equipe multi-institucional que oferece suporte aos usuários da plataforma e aos dados armazenados. Embora o TCGA e, conseqüentemente, o cBioPortal apresentem uma variedade de análises tumorais, não há até o momento nenhuma análise com tumores de células germinativas infantis, sendo as análises realizadas somente em pacientes adultos com TCGs. Portanto, inicialmente, os marcadores relacionados com a EMT (Tabela 2) foram avaliados nos pacientes adultos com TCGs.

Como descrito anteriormente, o banco de dados cBioPortal armazena dados de diversos consórcios e estudos multicêntricos. No presente estudo foi selecionado o conjunto dos dados de TCG testicular (TCGA, PanCancer Atlas), usando os dados de expressão de 149 amostras TCG testicular (TCGT), para avaliação dos marcadores EMT. Foi realizado o *download* dos dados brutos armazenados no banco de dados cBioportal e diferentes parâmetros foram avaliados, incluindo os dados clínico-patológicos dos pacientes, tais como subtipos histológicos, sobrevida livre de progressão e estágio tumoral. Esses parâmetros foram relacionados com os marcadores da EMT (Tabela 2).

Com a finalidade de correlacionar a expressão dos genes relacionados com EMT nos pacientes com TCGT, foram considerados os dados de expressão de mRNA RNASeq V2 RSEM armazenados no cBioPortal, usando o *software* IBM SPSS para as análises estatísticas e o programa *R studio* para as análises de bioinformáticas. As expressões de *SNAIL* e *SLUG* foram avaliadas seguindo a mediana dos grupos e suas respectivas expressões dos genes.

Tabela 2- Genes relacionados com a EMT que foram avaliados nas análises *in silico*.

Mecanismo	Genes
Alta expressão durante a EMT	ACTA2, BMP1, CALD1, CDH2 (N-Cadherin), COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A2, FN1, FOXC2, IGFBP4, ITGA5, MMP2, MMP3, MMP9, SERPINE1, SNAI1 (SNAIL), SNAI2, SNAI3, SOX10, SPARC, TCF4, TIMP1, TWIST1, VCAN, VIM, WNT5A, WNT5B
Baixa expressão durante a EMT	CDH1 (E-Cadherin), IL1RN, KRT19, OCLN, SPP1, TFPI2
Diferenciação e Desenvolvimento	AKT1, BMP1, BMP2, BMP7, COL3A1, COL5A2, CTNNB1, ERBB3, FOXC2, NOTCH1, SMAD2, SNAI1, SNAI2, SOX10, TGFB2, TGFB3, TWIST1, WNT11, WNT5A, WNT5B
Morfogênese celular	CTNNB1, FOXC2, SMAD2, SNAI1, SOX10, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TWIST1, WNT11, WNT5A
Crescimento e proliferação celular	AKT1, BMP1, BMP7, CAV2, CTNNB1, EGFR, ERBB3, FOXC2, IGFBP4, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TIMP1, VCAN, ZEB1
Migração celular e motilidade	CALD1, CAV2, EGFR, FN1, STAT3, TGFB1, VIM
Reguladores do citoesqueleto	CAV2, VIM
Matriz Extracelular (MEC) e Moléculas de Adesão Celular	BMP1, BMP7, CDH1 (E-CADERINA), CDH2 (N-CADERINA), COL1A2, COL3A1, COL5A2, CTNNB1, EGFR, ERBB3, FN1, FOXC2, MMP3, MMP9, SERPINE1, SPP1, TGFB1, TGFB2, TIMP1
Transdução de Sinal	CAV2, KRT19, COL3A1, ITGA5, FOXC2, NOTCH1, EGFR, ERBB3, SPARC, BMP1, BMP2, BMP7, COL3A1, SMAD2, TGFB1, TGFB2, TGFB3, CTNNB1, GSK3B, WNT11, WNT5A, WNT5B
Fatores de transcrição	CTNNB1, ESR1, FOXC2, GSC, NOTCH1, GEMIN2, SMAD2 (MADH2), SNAI1, SNAI2, SNAI3, SOX10, STAT3, TCF3, TCF4, TWIST1, ZEB1, ZEB2
Células-tronco tumorais	MMP2, MMP9

4.2 Cultivo de linhagens de tumores de células germinativas (TCGs)

Para análise da expressão de SLUG em TCGs foram utilizadas as seguintes linhagens comerciais: 577MF (metástase de teratoma maligno) e 1777N (carcinoma embrionário) obtidas a partir da coleção de culturas celulares Européia (*European Collection of Cell Cultures* - ECACC, Salisbury, United Kingdom), NTERA-2 (carcinoma embrionário) e JEG-3 (coriocarcinoma) obtidas a partir da coleção de culturas norte americana (*American Type Culture Collection* – ATCC, Virginia, United States). Para a transfecção com os vetores foi utilizado a linhagem HEK293FT (CRL3216, ATCC).

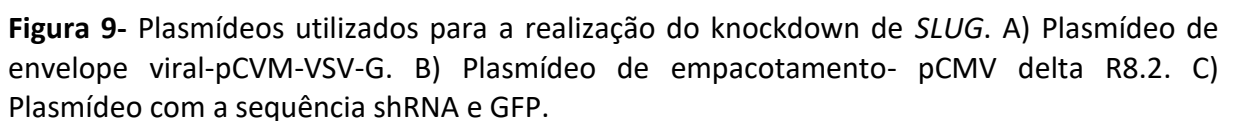
Após a avaliação gênica e proteica foi possível selecionar a linhagem celular 1777N para seguir com os experimentos propostos. De uma forma geral, as células foram cultivadas em meio DMEM (Life Technologies) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF - Life Technologies) e 1% de Penicilina/ Streptomicina (Life Technologies) em frascos de cultura de 25 e 75cm², mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingirem confluência. Após confluência, as células foram tripsinizadas (solução tripsina 0,05% / EDTA 0,53 mM- TripLE Express, Life Technologies) e plaqueadas para seguir com os experimentos propostos. Todas as linhagens celulares usadas foram autenticadas pelo laboratório de diagnóstico do Hospital de Câncer de Barretos por tipagem de DNA por repetição curta em tandem (STR) de acordo com o padrão de referência internacional para autenticação de linhas de células humanas e foram mantidas negativas para *Mycoplasma*. Os testes para detecção de micoplasma foi realizado quinzenalmente usando *MycoAlert Mycoplasma Detection Kit* (Lonza).

4.3 Knockdown do fator de transcrição SLUG na linhagem de TCG

4.3.1 Processo de transformação de bactérias competentes

Para a produção de lentivírus para fins de *knockdown*, foi utilizado plasmídeos pGiPZ codificando sequências de shRNA (*short-hairpin RNA*) que reconhecem especificamente RNA de SLUG, promovendo sua degradação e silenciamento (Figura 8). Como controle, foi utilizado esse mesmo plasmídeo, mas codificando uma sequência de shRNA que não tem ligação celular específica (NSC - *Non-Silencing-Control*).

O vetor pGiPZ também codifica para o gene de resistência à puomicina e proteína fluorescente verde (GFP - *Green Fluorescent Protein*), permitindo a seleção das células transduzidas e o rastreamento das mesmas. Todos os plasmídeos utilizados em nosso estudo foram cedidos pela pesquisadora Dra. Claudia Rodrigues da *Florida Atlantic University* - EUA.



4.3.2 Cultura de bactérias em meio líquido

Após a transformação de bactérias competentes, foram coletadas duas colônias recombinantes, inoculado a 3 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e incubado sob agitação de 180 rpm a 37°C *overnight*.

4.3.3 Extração do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *NucleoBond® Xtra Midi* (Macherey-Nagel™). O meio contendo as bactérias foi centrifugado a 6.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 8 mL do reagente RES para ressuspender as bactérias presentes no *pellet*. Em seguida, foi adicionado 8 mL do reagente LYS e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se 8 mL de NEU, centrifugou-se a 6.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foi preparado o filtro adicionando 12 mL do reagente EQU, adicionou-se o sobrenadante no filtro. Em seguida, foi adicionado 5 mL do EQU, o filtro foi descartado e acrescentou-se 8 mL de WASH na coluna. Após lavagem, foi adicionado 5 mL ELU, sendo o conteúdo coletado em falcon e acrescentado 3,5 mL de Isopropanol, concluindo a etapa de eluição. O conteúdo foi filtrado, adicionou-se 2 mL de Etanol 70%, filtrou-se novamente e eluiu em 400 µL de água Milli-Q. Por fim, a quantificação foi realizada por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

4.3.4 Produção de lentivírus em células HEK293FT (transfecção)

Para o *knockdown* do gene *SLUG*, foi necessário a construção do vetor a partir dos plasmídeos: pCMVR8.2, pCMV delta R8.2 e pGIPZ (Figura 9). Foi adquirido o sistema *short hairpin RNA* com a sequência do RNA desejada, shSLUG (GIPZ™ Lentiviral shRNA).

Para a transfecção, as células HEK293FT foram plaqueadas em placas de 6 poços (2×10^5 células/poço) ou em placas 100 mm (3×10^6 células/placa), com confluência de aproximadamente 80% e cultivadas em meio DMEM (Life Technologies) suplementado com 10% de SBF (Life Technologies) e 1% de Penicilina/ Streptomicina (Life Technologies). No dia seguinte, o meio de cultivo das células HEK293FT foi trocado adicionando-se meio DMEM 10% SBF. Para transfecção em placa de 6 poços, adicionou-se 150 µL de meio DMEM sem adição de SBF e 3,6 µL de Lipofectamine™3000 (Invitrogen, EUA) em um tubo de polipropileno e incubou-se durante cinco minutos em temperatura ambiente. Em outro tubo, foram adicionados 150 µL de meio DMEM sem adição de SBF, 2,4 µL P3000 (Invitrogen, EUA), 200 ng

de pCVM-VSV-G, 400 ng de pCMV delta R8.2, 600 ng do plasmídeo contendo o gene de interesse, ou seja, os plasmídeos codificando o fator de transcrição *SLUG* e a proteína verde fluorescente GFP, como marcador para seleção. Ainda, foi utilizado um vetor *NSC* (*non silence control*) como controle.

Para transfecção em placa de 100 mm utilizou-se o mesmo protocolo descrito anteriormente, entretanto adicionou-se 1,5 mL de meio DMEM sem adição de SBF e 36 µL de Lipofectamine™3000 (Invitrogen, EUA). Em outro tubo, foram adicionados 1,5 mL de meio DMEM sem adição de SBF, 24 µL P3000 (Invitrogen, EUA), 2000 ng de pCVM-VSV-G, 4000 ng de pCMV delta R8.2, 6000 ng do plasmídeo contendo o gene de interesse, conforme o protocolo mostrando na Figura 10. Em seguida, o conteúdo dos dois tubos foi misturado e a solução foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo determinado, a solução foi adicionada à placa de cultura contendo as células HEK293FT (Thermofisher) por meio de gotejamento. Após seis horas da transfecção, o meio de cultivo foi trocado adicionando-se DMEM 10% SBF e as células foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C.

Após 48 horas da transfecção, o sobrenadante das células HEK293FT transfectadas e que continham os lentivírus foi coletado e adicionou-se novo meio de cultura na placa para nova coleta. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em membrana de PVDF 0,45 µm e utilizado para a transdução da linhagem 1777N. O mesmo procedimento foi repetido após 72 horas da transfecção.

4.3.5 Transdução das linhagens de tumores de células germinativas com lentivírus

As células 1777N foram transduzidas para o *knockdown* de *SLUG* - shSLUG (Figura 10). Para a infecção das linhagens com os lentivírus gerados, as mesmas foram plaqueadas no dia anterior ao experimento. Para a transdução em placa de 6 poços, as células 1777N foram plaqueadas na densidade 8×10^4 células/poço e, para a transdução em placa de 100 mm, plaqueou-se 1×10^6 células/placa.

Em seguida, o meio de cultivo foi removido e a transdução foi realizada adicionando-se o sobrenadante viral à placa, acrescido de polibrene (Sigma-Aldrich) na concentração final de 8,0 µg/mL. Após seis horas da transdução, o meio de cultivo foi trocado e as células foram incubadas em 5% de CO₂ a 37°C. Foram realizados dois ciclos de transduções, com tempo de incubação de 24 horas.

Por fim, quando as células transduzidas ficaram GFP+, o tratamento com puromicina

(20 µg/mL) foi iniciado e após confluência as mesmas foram utilizadas para experimentos de avaliação da EMT.

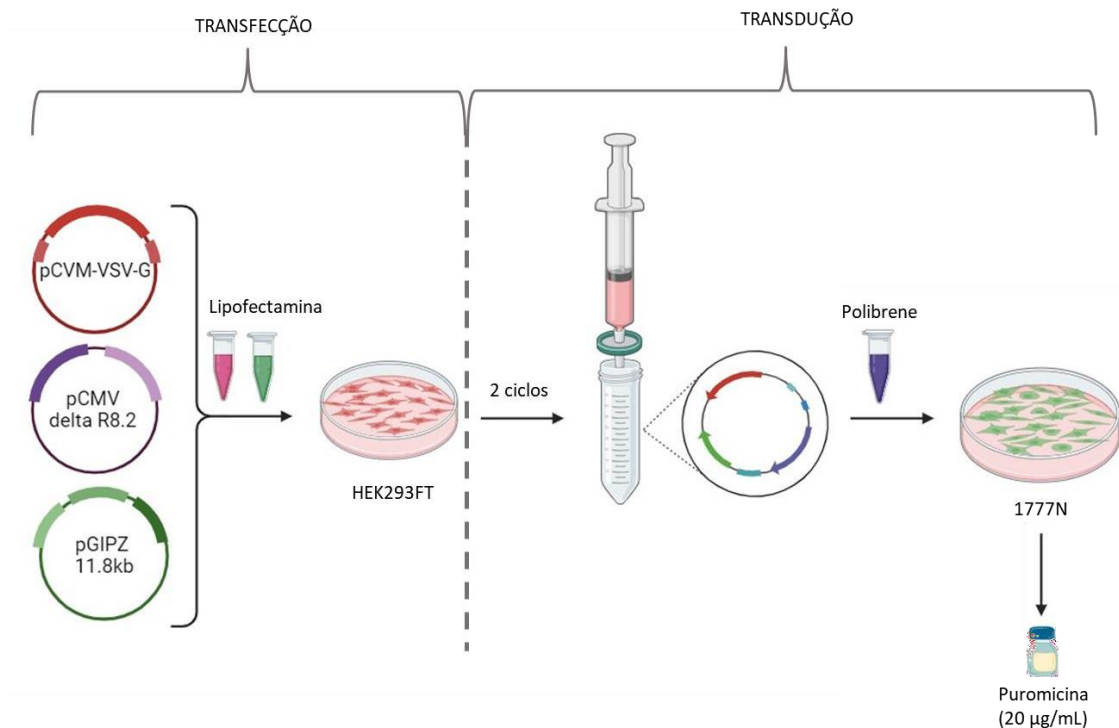


Figura 10- Representação do protocolo de silenciamento de *SLUG*. A transfecção foi realizada nas células HEK293FT usando os plasmídeos de interesse e o reagente Lipofectamina. O sobrenadante contendo os lentivírus foi coletado, filtrado e utilizado para a transdução das células 1777N, com auxílio do polibrene. As células GFP+ foram selecionadas por puomicina.

4.4 Análise da expressão gênica

As linhagens transduzidas com *SLUG* (shSLUG) e controle (shNSC) mantidas em cultura, foram coletadas em 1mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen, EUA).

O RNA total das linhagens celulares foi extraído pelo método TRIzol® Reagent, segundo instruções do fabricante (Invitrogen). O RNA foi precipitado, eluído em H₂O ultrapura e quantificado em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

A transcrição reversa do RNA total em DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante. Em seguida, o cDNA foi utilizado na PCR em tempo real.

A expressão gênica do fator de transcrição *SLUG*, bem como dos marcadores relacionados com a EMT (*E-CAD*, *N-CAD*, *VIM* e *SNAIL*) foram quantificados por PCR quantitativo em tempo real utilizando o método *TaqMan*® (Applied Biosystems). A quantificação do gene endógeno *GAPDH* foi utilizada para a normalização da reação,

utilizando o método de cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. As reações de amplificação foram conduzidas no equipamento *QuantStudio 6 Real-Time PCR System* (ThermoFisher Scientific).

4.5 Análise da expressão de proteínas

Para análise da expressão de proteínas, as células 1777N shNSC e shSLUG foram lavadas com DPBS (1X) para tirar resquícios de meio de cultura e células mortas. As proteínas foram coletadas em tampão de lise mais inibidores de protease (50 mM Tris-HCl, pH7.6, 150 mM NaCl; 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 1 mM de Na₃VO₄; 10mM de NaF, 10 mM de pirofosfato de sódio e 1% de NP40) contendo os inibidores de protease (0,01 M EDTA; 1 mM de DTT; 1 mM de Leupeptina; 1 mM de PMSF e 0,1 μ M de aprotinina). Em seguida, o extrato de proteína foi incubado em gelo por uma hora e centrifugado a 13.000rpm por 15 minutos a 4°C. O concentrado de proteína total foi estimado através de uma curva padrão de BSA utilizando o reagente de Bradford (*Quick Start Bradford Protein Assay*; Bio- Rad, USA), seguindo as instruções do fabricante.

As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE, separadas de acordo com o peso molecular e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A seguir, a membrana foi incubada com anticorpos primários anti-SLUG (Cell Signaling, Ref. #9585) anti-E-caderina (Cell Signaling Ref. #3195S), anti-N-caderina (Cell Signaling #4061S) e anti-ACTB (Cell Signaling, Ref. #8457), posteriormente com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-rabbit). Para a revelação da membrana, foi utilizado o kit *SignalFire™ ECL Reagent* (Sigma-Aldrich) para a marcação da ACTB e para avaliar as demais proteínas foi usado *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific), conforme as especificações do fabricante. Para a detecção de sinal quimioluminescente foi utilizado o sistema de foto documentação *Image Quant LAS 4000mini* (GE Healthcare). Em seguida, as bandas marcadas foram analisadas e quantificadas utilizando o *software Image J*. O anticorpo ACTB foi usado como controle para normalizar a quantidade de proteínas aplicada.

4.6 Ensaio de migração celular

As células 1777N shNSC e shSLUG foram avaliadas quanto a capacidade migratória. Para a análise de migração celular foi realizado o *scratch assay*, no qual as linhagens foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/poço em placa de 6 poços. Após 80-90%

confluência, foi realizado uma ranhura na monocamada de células com o auxílio de uma ponteira estéril. As células foram fotografadas em três momentos diferentes após a ranhura: momento zero, 24 horas e 48 horas. Durante o ensaio de migração todas as células foram mantidas em 5% de CO₂ a 37°C. O experimento foi realizado em duplicata. As espessuras obtidas (zero e 48 horas) foram mensuradas usando o *software ImageJ*. A porcentagem da migração foi medida pela seguinte fórmula = $[1 - \text{espessura final} / \text{espessura inicial}] \times 100$.

4.7 Ensaio de invasão celular

A capacidade de invasão celular das células 1777N shNSC e shSLUG foi avaliada pelo ensaio de invasão usando matrigel com a utilização do *BioCoat Matrigel Invasion Chambers* (BD Biosciences).

Para o ensaio foi usado uma placa de 24 poços, separando cada poço em duas câmaras (superior e inferior). A câmara superior contém uma membrana de polycarbonato de 8 µm de diâmetro possuindo seus poros cobertos por matrigel. Foram plaqueadas 4×10^5 células/poço e adicionado 500 µl de meio DMEM (Life Technologies) com 1% de Penicilina/ Streptomicina (Life Technologies) sem SBF. A invasão foi avaliada nas células contendo o *knockdown de SLUG* e NSC. O experimento foi realizado em duplicata.

Na câmara inferior foi adicionado 750 µl de meio DMEM (Life Technologies) suplementado com 10% de SBF (Life Technologies) e 1% de Penicilina/ Streptomicina (Life Technologies), e incubou-se a 37°C por 24 horas. A câmara foi lavada com 500 µl PBS 1x e fixadas em 500 µl metanol. O excesso de células foi removido e o inserto foi corado com hematoxilina e eosina. Lavou-se com água destilada e deixou-se secando *overnight*. A membrana foi removida do inserto e a lâmina foi preparada com auxílio do *Entellan* (Sigma-Aldrich). As membranas foram fotografadas e quantificadas por *ImageJ*.

4.8 Ensaio de viabilidade celular - MTS

A fim de estabelecer o IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento celular) da cisplatina nas células 1777N shNSC e shSLUG, foi usado o ensaio *CellTiter Proliferation* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante. Foram plaqueadas 5×10^3 células/poço em placa de 96 poços em triplicata. No dia seguinte, as células foram tratadas com cisplatina em sete doses diferentes (0,0625 µM, 0,625 µM, 3,125 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM) e incubadas a 37°C por 72 horas. O reagente MTS foi adicionado na placa e as mesmas foram

incubadas a 37°C por duas horas. A absorbância foi lida no *Varioskan Flash* (Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda 490 nm.

4.9 *xCELLigence*

Para avaliar o efeito da cisplatina nas linhagens *shNSC* e *shSLUG* foi realizado o ensaio de proliferação *xCELLigence Real-Time Cell Analysis* (Agilent Technologies).

As células *shNSC* e *shSLUG* foram tratadas com a concentração de 5,3µM, dose de IC₂₅ previamente determinada das células *shNSC*. As células foram plaqueadas na densidade de 1 x 10⁴ células/poço em 16 poços na placa *E-plate* para a leitura da impedância pelo aparelho *xCELLigence Real-Time Cell Analyzer* (RTCA). Após 24 horas do plaqueamento, foi adicionado a cisplatina na concentração de 5,3 µM em 8 poços e NaCl em 8 poços usados como controle, as células foram incubadas a 37°C por 72 horas. Após 72 horas da adição da cisplatina, o experimento foi encerrado e os dados foram analisados.

4.10 Imunofluorescência

Para avaliar a morfologia das células tumorais 1777N *shNSC* e *shSLUG*, tanto controle quanto tratadas com cisplatina, as lamínulas usadas para o plaqueamento foram previamente tratadas com Poly-D-Lysine (PDL). As células foram então plaqueadas na densidade de 4 x 10⁴ células por lamínula.

Após o período de adesão foi adicionado o tratamento com cisplatina e mantido por 24 horas. No dia seguinte, as células foram lavadas com DPBS, fixadas com paraformaldeído 4% e permeabilizadas com Triton X-100. Em seguida, foi realizado o bloqueio com BSA a 3%, seguido pela incubação com o anticorpo primário anti-SLUG (Cell Signaling) na diluição de 1:400, overnight a overnight a 4 °C.

As células foram incubadas com o anticorpo secundário, Alexa Fluor™ 594 (Thermo fisher # A-11012) por 1 hora em temperatura ambiente. Foram lavadas 3x com DPBS e os núcleos corados com DAPI (Sigma-aldrich-Fluoroshield™ with DAPI). Em seguida, as lamínulas foram coladas em lâminas. As imagens representativas das células foram obtidas utilizando microscopia de fluorescência (Olympus, Fluoview FV10, Shinjuku, Tóquio, Japão) com ampliação de 60x.

As imagens foram marcadas com GFP (verde), Alexa Fluor 594 (vermelho) e DAPI

(azul). Para as combinações merge 01 e merge 02 foram feitas para melhor visualizar as estruturas celulares.

4.11 Análises estatísticas

Inicialmente, os dados foram tabulados considerando os valores de expressão, as estatísticas descritivas para os dados quantitativos e as tabelas de frequência para as variáveis qualitativas. Quanto aos parâmetros clínicos foram analisados a sobrevida livre de progressão, considerando os tempos entre a data da cirurgia e a data do óbito, data da metástase ou data da última consulta e o evento considerado será o óbito e metástase, respectivamente. A probabilidade de sobrevida foi estimada utilizando o método de Kaplan-Meier e a comparação das curvas através do teste de Log-rank. Para múltiplas comparações foi aplicado a correção de Bonferroni seguido do teste Long-rank.

Os testes-T e ANOVA foram utilizados para as análises univariadas para avaliar as alterações em relação aos níveis de expressão de genes e proteínas e foram usados para analisar a migração e invasão celular.

Para as análises foi utilizado o programa estatístico *IBM SPSS 20.0 for Windows* e a significância estatística foi considerada para os valores de $p \leq 0,05$. Para a análise de comparação de três ou mais grupos foi usado o teste ANOVA e para a comparação entre dois grupos, o teste T de *student*.

4.12 Considerações éticas

Esse estudo obedeceu aos critérios éticos em conformidade com a resolução CNS nº 466 de 2012. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança e pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos (HCB), sendo aprovado pelo parecer de número 2258/2021. O estudo está cadastrado no Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) pelo número 330/2011.

5 RESULTADOS

Parte dos resultados obtidos nesse estudo foram aceitos para publicação na *Molecular Medicine Reports*. O aceite da revista e o artigo científico estão no Anexo A. A seguir, será apresentado todos os resultados obtidos.

5.1 Análise *in silico* dos marcadores da EMT

Para as análises *in silico* dos marcadores da EMT em TCGs, foi utilizado um banco de dados do cBioPortal de TCGT que contém, inicialmente, 149 pacientes, incluindo: 17 carcinoma embrionário, 63 TCG misto, 63 seminoma, três teratomas e três seio endodérmico. Após *download* e normalização dos dados, foram considerados 89 pacientes, incluindo 49 seminoma, 29 TCG misto e 11 carcinoma embrionário (Figura 11). A exclusão dos demais 60 pacientes justifica-se por dois motivos: i) falta dos dados de expressão gênica de *SNAIL* e *SLUG*; ii) conter somente um paciente com teratoma e um paciente seio endodérmico, havendo uma baixa representatividade amostral.

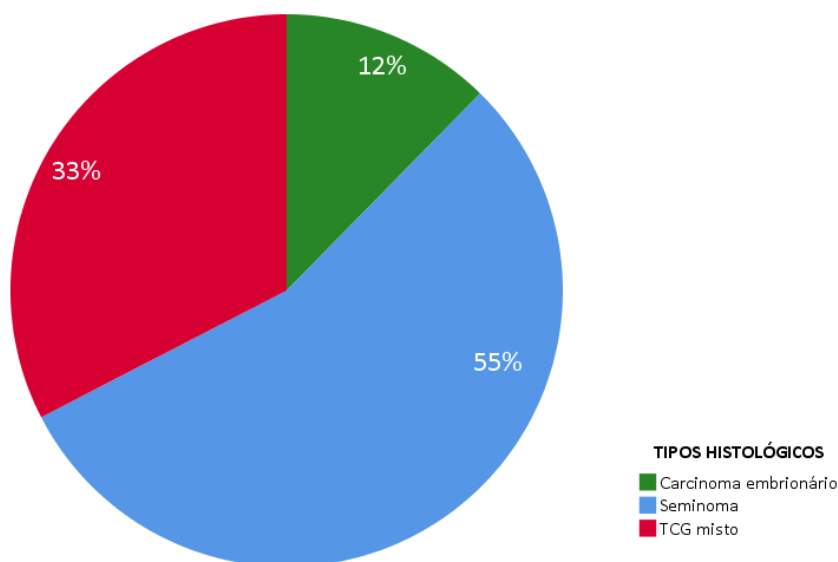


Figura 11- Gráfico de setores representando os tipos histológicos considerados nas análises *in silico*. Os dados dos pacientes com tumores de células germinativas testiculares (TCGT) foram obtidos na plataforma cBioPortal e foram considerados as histologias seminoma (n=49), carcinoma embrionário (n=11) e TCG misto (n=29).

Visto o importante papel da EMT no desenvolvimento do câncer, foram selecionados os genes envolvidos nesse processo (Figura 12). Conforme Figura 12A, é possível observar que

Figura 12- *Heatmap* da expressão dos genes relacionados com a EMT em carcinoma embrionário (azul), TCG misto (vermelho) e seminoma (verde). A) *Heatmap* dos genes relacionados com a EMT. B) *Heatmap* de 17 fatores de transcrição envolvidos na EMT. As linhas indicam os níveis de expressão relativos para um único gene e as colunas indicam o nível de expressão para uma única amostra. Azul e vermelho indicam os genes com níveis de expressão mais baixos e mais altos, respectivamente.

Com a separação dos grupos histológicos, três amostras de TCG misto agruparam junto com os seminomas. Ao avaliar a porcentagem dos tipos histológicos que compõem as amostras dos TCG mistos (Anexo B), observou-se que todas possuíam maior porcentagem de seminoma (Tabela 3).

Tabela 3- Tabela com as porcentagens das três amostras de TCG misto com as porcentagens dos tipos histológicos que as compõem.

TCG MISTO	
Identificação da amostra	% Histológica
TCGA_2G_AA33	Teratoma maduro+ teratoma imaturo, seminoma 35%, 5% seio endodérmico
TCGA_AAL7	Seminoma 95% e seio endodérmico 5%
TCGA_SN_A6IS	Seminoma 85% e teratoma maduro 15%

Para elucidar a expressão de *SNAIL* e *SLUG* nos TCGs testiculares (TCGT), a expressão desses fatores foi avaliada individualmente nos três tipos histológicos (carcinoma embrionário, TCG misto e seminoma). Os resultados mostram significância na expressão de *SLUG* ($p < 0,0001$), o qual foi regulado positivamente em TCG misto em comparação com carcinoma embrionário e seminoma (Figura 13A). Nenhuma diferença foi observada na expressão de *SNAIL* ($p = 0,665$) nas diferentes histologias (Figura 13B).

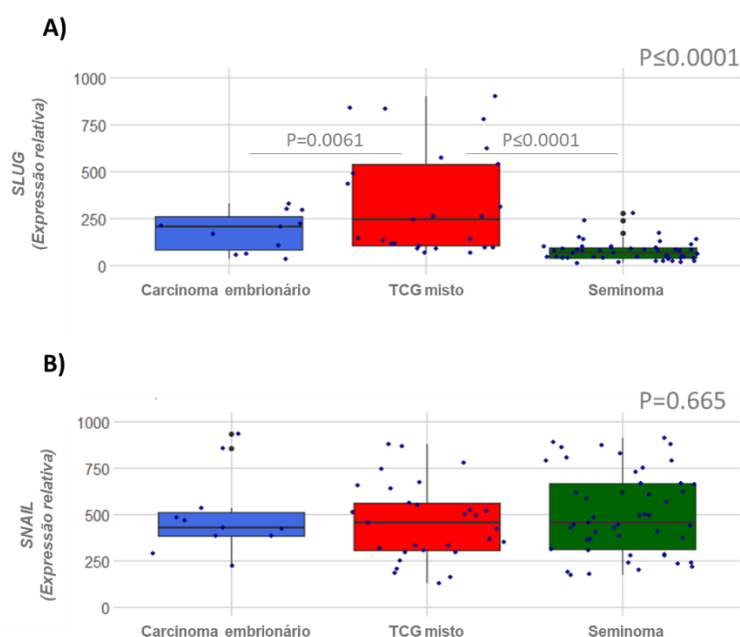


Figura 13- Boxplot da expressão de *SNAIL* e *SLUG* nos TCG testicular. Expressão de *SLUG* (A) e *SNAIL* (B) em carcinoma embrionário, TCG misto e seminoma.

A sobrevida livre de progressão (*Progression Free Survival* - PFS) dos 89 pacientes foi avaliada e observou-se melhor PFS nos pacientes com histologia seminoma comparado com carcinoma embrionário (49.9 meses vs. 27.6 meses) e TCG misto (49.9 meses vs. 28.6 meses) (Figura 14).

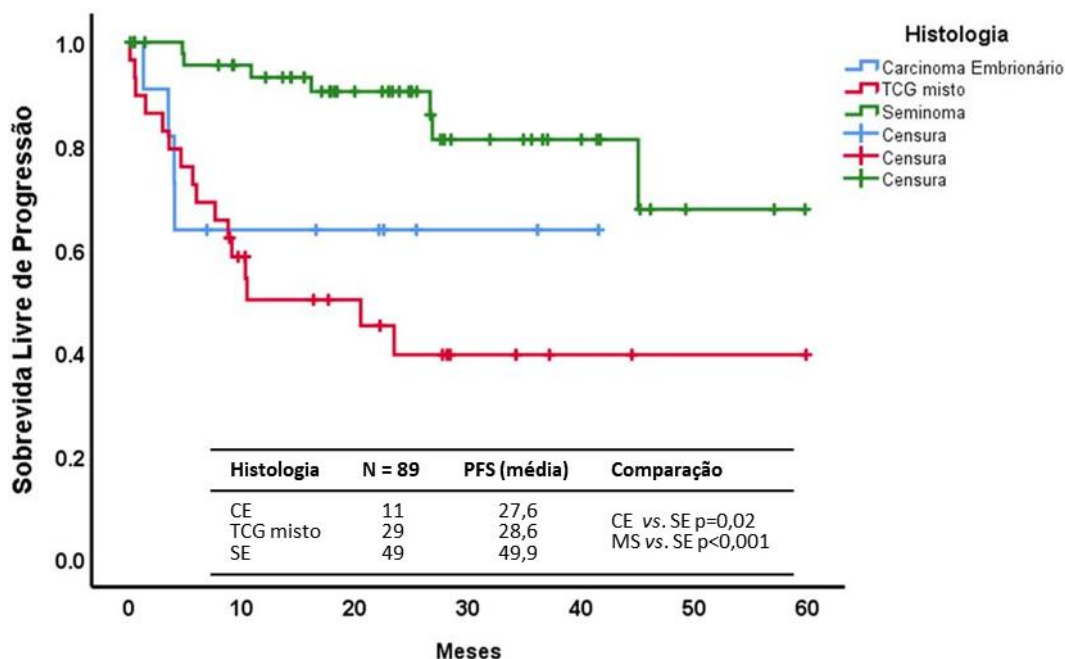


Figura 14- Sobrevida livre de progressão dos pacientes com TCG testicular. Sobrevida livre de progressão considerando os tipos histológicos carcinoma embrionário (CE), TCG misto e seminoma (SE).

Foi realizado a análise dos níveis de expressão individuais dos fatores de transcrição *SNAIL* e *SLUG*. Embora não estatisticamente significativos, os pacientes com baixa e alta expressão de *SNAIL* tiveram durações medianas de PFS de 47,2 e 29,7 meses, respectivamente ($p = 0,067$, Figura 15A). Pacientes com baixa expressão de *SLUG* tiveram uma PFS mediana de 46,4 meses, em comparação com 28,0 meses para aqueles com maior expressão de *SLUG* ($p = 0,022$, Figura 15B).

Em seguida, foi realizado uma análise em conjunto considerando alta e baixa expressão de *SNAIL* e *SLUG* (Figura 15C), sendo a mediana da expressão dos respectivos genes avaliados o método escolhido para separar os grupos. Para *SLUG* o *cut-off* (ponto de corte) foi de 94,63 e para *SNAIL* foi 748,7 para a separação dos grupos em baixa e alta expressão.

Pacientes com baixos níveis de expressão de ambos os fatores de transcrição (*SNAIL*^{baixo}*SLUG*^{baixo}) apresentaram maior PFS em comparação com aqueles com alta expressão (*SNAIL*^{alto}*SLUG*^{alto}), com PFS de 54,3 meses e 16,5 meses, respectivamente (p = 0,006, Figura 15C).

Os pacientes com *SNAIL*^{baixo}*SLUG*^{baixo} apresentaram tendência de maior PFS em comparação com aqueles com alta expressão de *SNAIL* e baixa expressão de *SLUG* (*SNAIL*^{alto}*SLUG*^{baixo}), com PFS de 54,3 meses vs. 34,1 meses (p = 0,049, Figura 15C). Embora a diferença na PFS entre pacientes *SNAIL*^{baixo}*SLUG*^{baixo} e *SNAIL*^{baixo}*SLUG*^{alto} não tenha alcançado significância estatística, houve uma tendência favorecendo maior PFS em pacientes *SNAIL*^{baixo}*SLUG*^{alto} (54,3 meses vs. 31,1 meses; p = 0,059, Figura 15C).

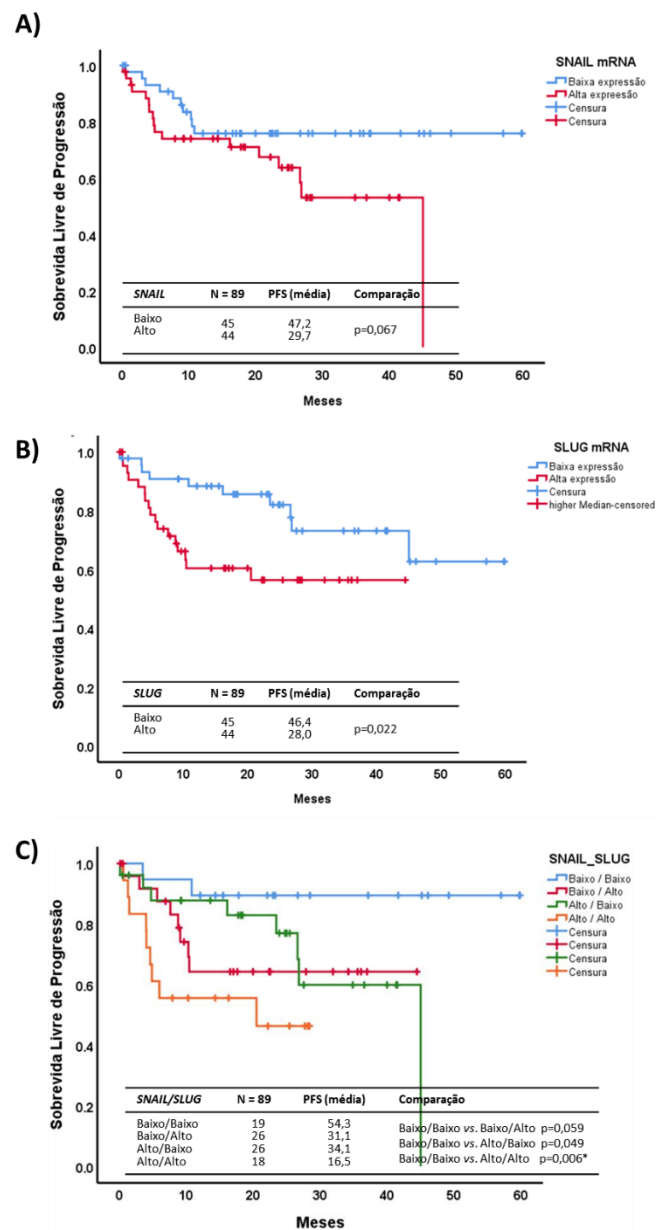


Figura 15- Sobrevida livre de progressão dos pacientes com TCG testicular baseadas na expressão dos genes *SNAIL* e *SLUG*. Associação da expressão individual dos fatores de transcrição (A) *SNAIL* e (B) *SLUG* com sobrevida livre de progressão (PFS). C) Associação da combinação da expressão de *SNAIL* e *SLUG* com PFS. A correção de Bonferroni foi aplicada após o teste de log-rank com $\alpha=0,05/3=0,0167$ para (A) e $\alpha=0,05/6=0,0083$ para (D). *Valor significativo para log-rank + Bonferroni. Valores de p iguais ou menores que o limiar de correção de Bonferroni foram considerados significativos.

5.2 Screening das linhagens de tumores células germinativas

Para estabelecer o perfil de expressão de *SLUG* nas linhagens de TCG, foi realizado análise de expressão gênica e proteica nas linhagens 1777N, 577MF, NTERA-2, JEG-3 (Figura 16). A linhagem 1777N apresentou maior expressão de *SLUG* e, portanto, foi selecionada para os experimentos de silenciamento.

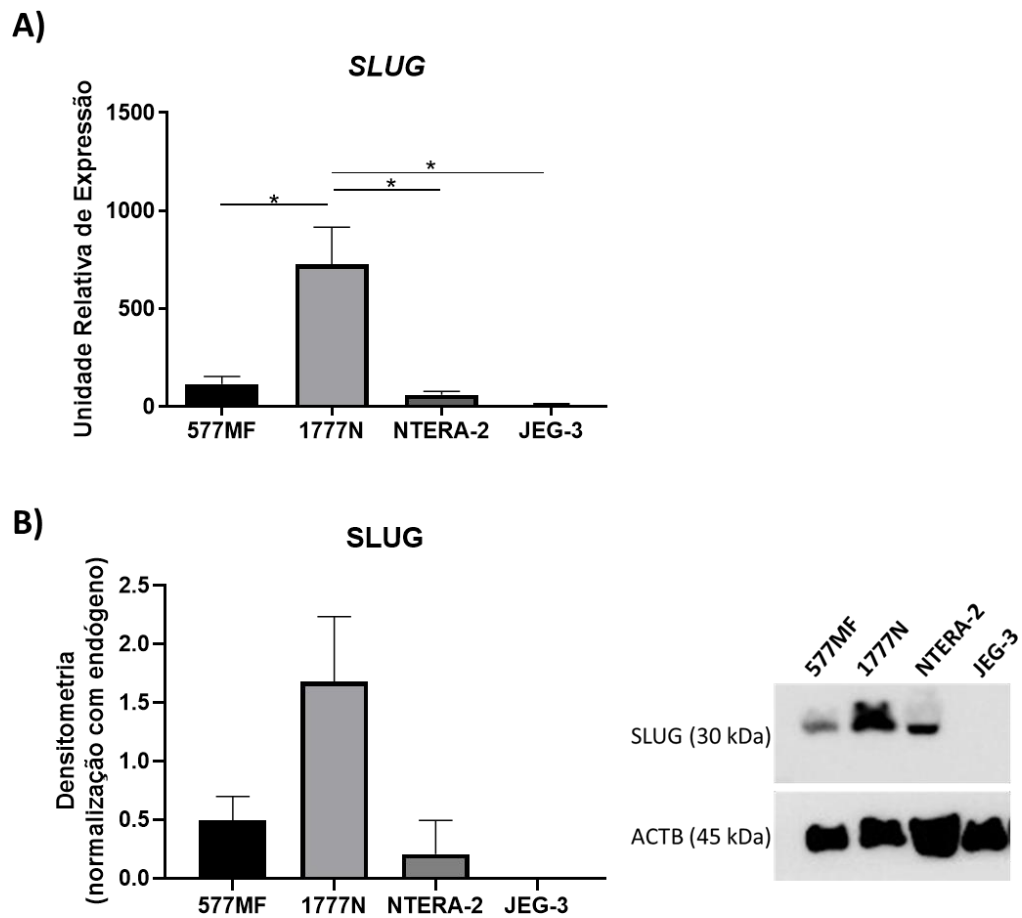


Figura 16- Análise da expressão de *SLUG* em diferentes linhagens de tumor de células germinativas. A) Expressão gênica de *SLUG*, nas linhagens 1777N, 577MF, JEG-3 e NTERA-2. B) Expressão proteica de *SLUG* nas linhagens 1777N, 577MF, JEG-3 e NTERA-2.

5.3 Silenciamento de *SLUG*

O *knockdown* de *SLUG* foi realizado na linhagem 1777N. As análises por *Western blot* mostraram a diminuição da expressão de *SLUG* com redução de aproximadamente 80% nas células sh*SLUG* (Figura 17).

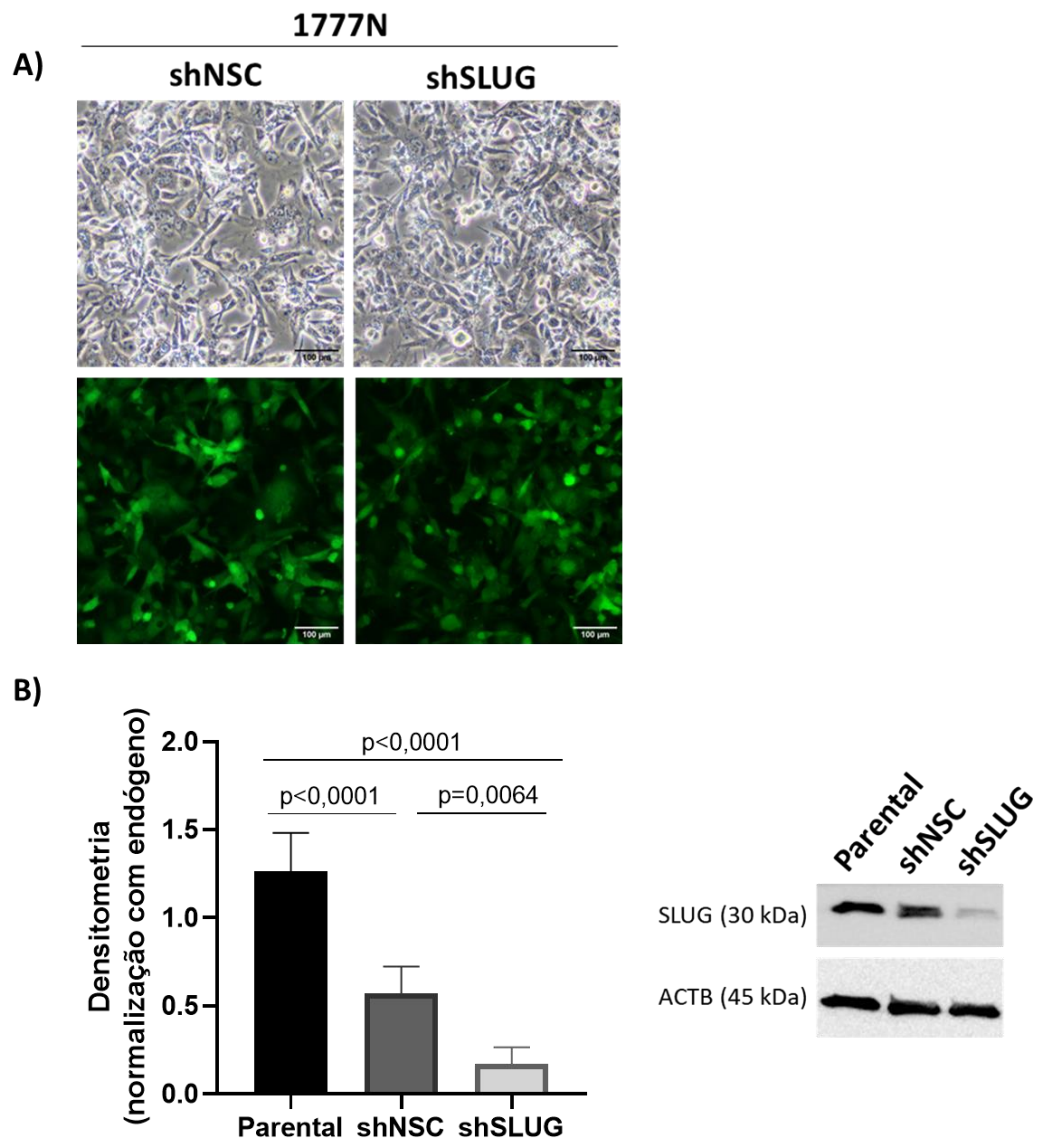


Figura 17- Silenciamento de *SLUG* na linhagem 1777N. A) Imagens do silenciamento de *SLUG* (shSLUG) e controle (shNSC) nas células 1777N, obtidas no campo claro e com marcação GFP (*Green Florescent Protein* - proteína verde fluorescente), no aumento de 10x. B) Análise da expressão proteica de *SLUG* nas células 1777N transduzidas com shNSC e shSLUG.

5.4 Expressão dos marcadores da EMT

Após realizar a inibição da expressão de *SLUG*, os marcadores relacionados a EMT foram avaliados por PCR em tempo real (Figura 18A). Os resultados mostram uma tendência na diminuição da expressão de *SLUG* e aumento de *E-CADERINA* e *SNAIL*. Ainda, foi realizado análise de expressão das proteínas *E-CADERINA* e *N-CADERINA*, mas nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 18B).

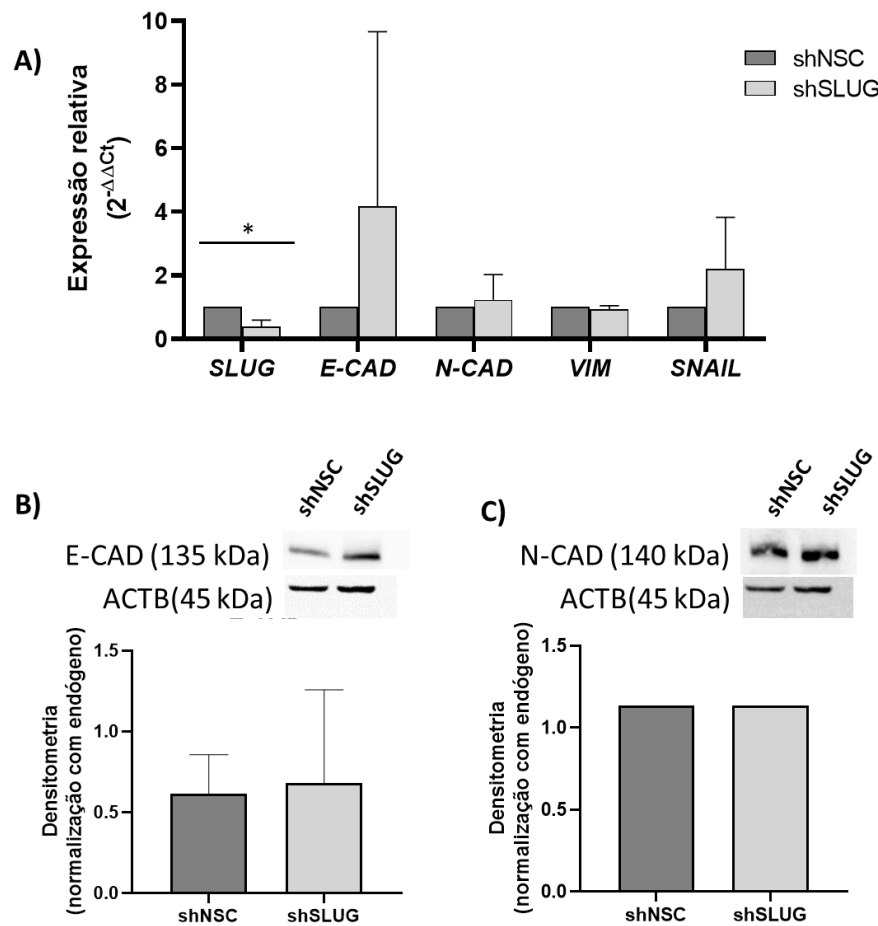


Figura 18- Análise da expressão dos genes relacionados com a EMT nas linhagens 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG). A) Avaliação da expressão gênica de *SLUG*, *E-CAD*, *N-CAD*, *VIM* e *SNAIL* nas linhagens 1777N shNSC e shSLUG (n=2). B) Expressão proteica do marcador epitelial E-CADERINA nas linhagens 1777N shNSC e shSLUG (n=2). C) Expressão proteica do marcador mesenquimal N-CADERINA nas linhagens 1777N shNSC e shSLUG (n=1).

5.5 Ensaio de migração

Após avaliar o *knockdown* de *SLUG* na linhagem 1777N, foi realizado o experimento de migração celular. Após análise dos dados, não foi observado diferença na porcentagem de migração ($P=0.283$) entre as linhagens shNSC e shSLUG (Figura 19).

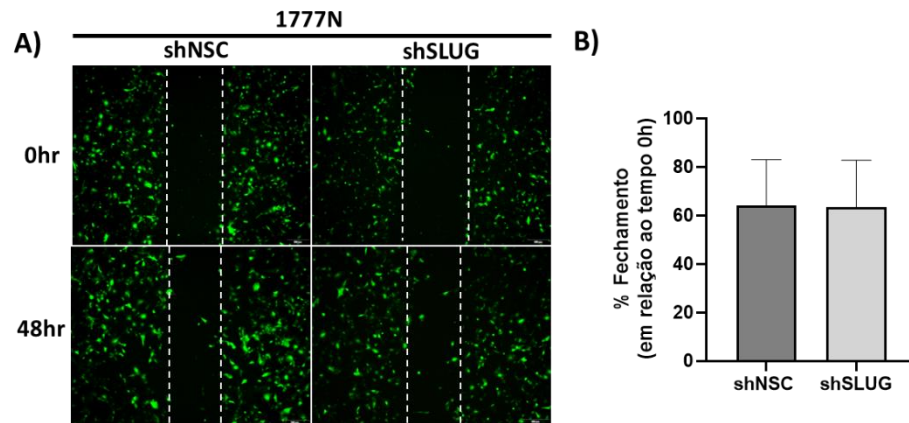


Figura 19- Ensaio de migração celular nas células 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG). A) Imagens representativa do ensaio de migração obtidas no aumento de 10x. B) Análise da porcentagem de migração celular. Experimentos realizados em duplicata.

5.6 Ensaio de invasão

Após avaliar o *knockdown* de *SLUG* na linhagem 1777N, foi realizado o experimento de invasão celular. Após análise dos dados, não foi observado diferença ($P=0,2803$) na porcentagem de invasão entre as linhagens shNSC e shSLUG (Figura 20).

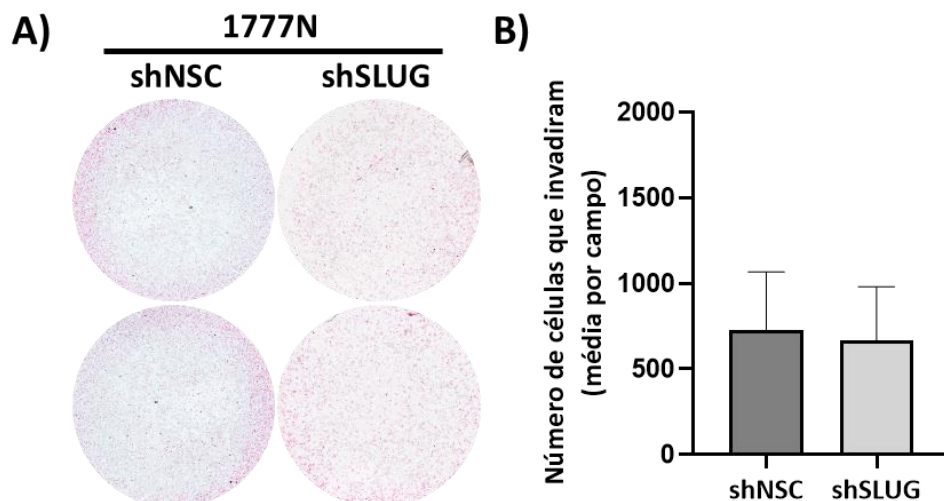


Figura 20- Ensaio de invasão nas células 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG). A) Imagens representativa do ensaio de invasão, obtidas no campo claro e no aumento de 10x. B) Análise da invasão celular demonstrando o número de células invasivas. Experimentos realizados em duplicata.

5.7 Ensaio de viabilidade celular- MTS

Visto que a EMT é relacionada com a resistência a drogas, foi investigado se o silenciamento de *SLUG* poderia intervir na sensibilidade à cisplatina. Dessa forma, o ensaio de viabilidade celular foi realizado para avaliar o IC_{50} das células 1777N shNSC e shSLUG após tratamento com cisplatina. As células foram tratadas com cisplatina com oito doses diferentes (0,0625 μ M, 0,625 μ M, 3,125 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M). As shSLUG apresentaram IC_{50} maior (IC_{50} = 16,68 μ M) comparado com as shNSC (IC_{50} = 12,51 μ M), não havendo diferença significativa. O experimento foi realizado em duplicata (Figura 21).

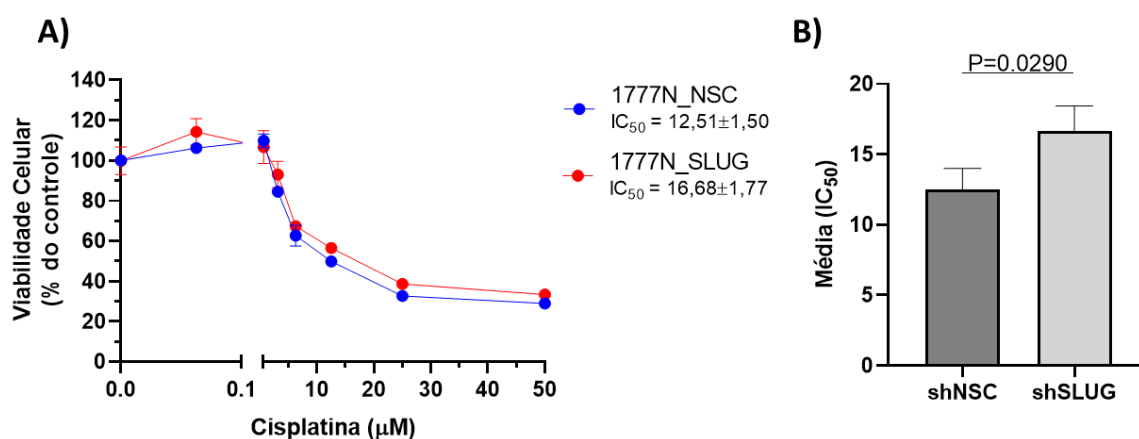


Figura 21- Viabilidade das células 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG) após o tratamento com cisplatina. A) A célula 1777N shNSC apresentou dose de IC_{50} maior (IC_{50} =12,51) em relação a 1777N shSLUG (IC_{50} =16,68). Os experimentos foram realizados em duplicata. B) Representação da média dos IC_{50} das células 1777N shNSC e shSLUG. $P=0.0290$.

5.8 Ensaio de proliferação celular- XCELLigence

Após avaliar o *knockdown* de *SLUG* na linhagem 1777N, foi realizado o experimento XCELLigence em triplicata, para assim avaliar o potencial de proliferação das células 1777N shNSC e 1777N shSLUG, com as células expostas ao tratamento com cisplatina na dose de 5,3 μ M. Os dados mostraram que as células 1777N shSLUG apresentaram maior proliferação comparado com as células shNSC ($P \leq 0,0001$). Quando as células foram tratadas com cisplatina, a 1777N shSLUG também apresentou maior proliferação comparada com a shNSC ($P \leq 0,0001$). Ainda, as células shNSC tratadas com cisplatina apresentaram menor proliferação comparada com as shNSC não tratadas (NaCl).

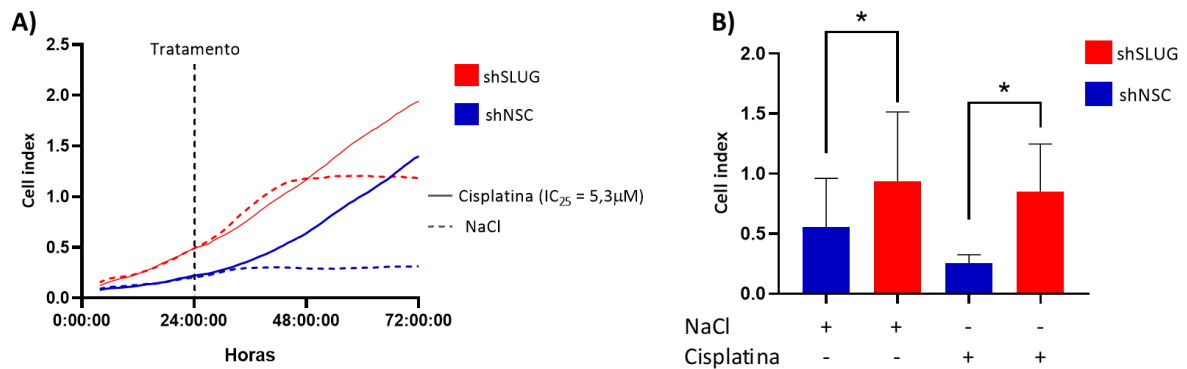


Figura 22- Análise da proliferação das linhagens 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG) após tratamento com cisplatina por 24 horas. A) Representação da proliferação das células shSLUG (vermelho) e shNSC (azul) tratadas com Cisplatina e NaCl com 24 horas após plaqueamento e acompanhadas até 72 horas. B) Comparação das células shSLUG e shNSC tratadas com e sem cisplatina. *P ≤ 0,0001.

5.9 Imunofluorescência

Após a marcação das células 1777N shNSC e shSLUG, com e sem tratamento com cisplatina, as imagens foram capturadas utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus, Fluoview FV10, Shinjuku, Tóquio, Japão). Após o tratamento com cisplatina, as células 1777N shNSC apresentaram alterações morfológicas, adquirindo um formato mais fusiforme e demonstrando menor adesão célula-célula (Figura 23). Observou-se a mesma mudança nas células 1777N shSLUG, que também adquiriram um formato fusiforme após o tratamento com cisplatina.

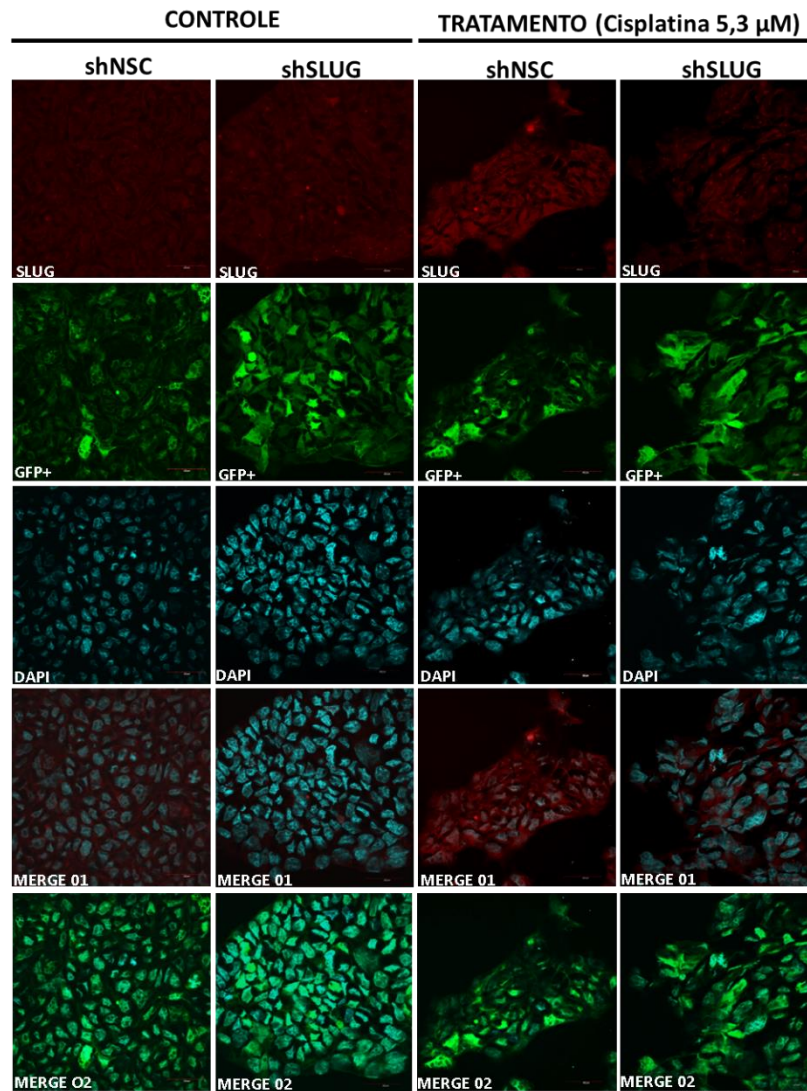


Figura 23- Análise da expressão de SLUG nas linhagens 1777N controle (shNSC) e com inibição de *SLUG* (shSLUG) após 24 horas de tratamento com cisplatina. Marcação feita com anti-SLUG (vermelho), GFP (verde), DAPI (azul). MERGE 01: DAPI+anti-SLUG e MERGE 02: DAPI+GFP. Imagem obtidas no aumento de 60x. O tratamento com cisplatina foi realizado com 5,3 μ M e o grupo controle foi tratado com NaCl.

6 DISCUSSÃO

Os TCGs pediátricos são tumores raros e heterogêneos, sendo um desafio estudar sua base genética, especialmente alternativas moleculares que possam levar à classificação histológica dos TCGs¹. Ainda, aproximadamente 10-20% dos pacientes são resistentes à quimioterapia padrão à base de cisplatina e vários mecanismos moleculares têm sido relacionados à quimiorresistência, incluindo o processo de EMT^{20, 24, 101, 102}. No presente estudo foi avaliado o fator de transcrição *SLUG*, um dos principais fatores relacionado com a EMT, nos TCGT.

Diversos fatores de crescimento e citocinas são considerados indutores da EMT, sendo responsáveis pela ativação de diferentes vias de sinalização que modulam os efetores desse processo, incluindo os fatores de transcrição *SNAIL* e *SLUG*^{22, 64, 106, 107}. Esses fatores reprimem o marcador epitelial E-caderina levando as células epiteliais a perderem gradualmente suas características e adquirirem propriedades de células mesenquimais^{25, 26, 54}.

O fator de transcrição *SNAIL* demonstra um papel inicial, com indícios de ser o primeiro fator de transcrição ativado durante as mudanças das características epiteliais para mesenquimais das células tumorais que passam pela EMT^{107, 108}. Por outro lado, *SLUG* demonstra sua ativação em estágios mais avançados da EMT, com a principal função de manter as características mesenquimais dos tumores, podendo ser relacionados com o fenótipo invasivo migratório das células tumorais ao longo da EMT^{106, 108}.

Nesse estudo, as análises *in silico* demonstraram que a expressão de *SNAIL* não teve impacto na PFS nos pacientes com TCGT, o que pode ser explicado pelo fato de sua ativação ocorrer no início da EMT. Entretanto, foi observado uma pior PFS em pacientes com maior expressão de *SLUG*. Birgit Hotz e colaboradores (2007) demonstraram que embora *SNAIL* e *SLUG* pertencem a mesma família, os mesmos podem desempenhar funções diferentes¹⁰⁹.

Birgit Hotz (2007) mostrou que o gene *SLUG* está presente em estágios mais avançados da doença e desempenha um papel importante na manutenção do fenótipo migratório do tumor¹¹⁰. Dessa forma, as vias de sinalização podem manter a ativação e expressão de *SLUG* em pacientes que apresentam recidiva ou recaída durante os cinco anos avaliados na PFS^{108, 110, 111}. Em alguns desses casos, o tumor recidiva de forma mais agressiva e com maior probabilidade de metástase. Esse comportamento sugere que pacientes com baixa expressão de *SLUG* apresentam um perfil epitelial e uma certa normalidade nas células

tumorais. Em contrapartida, pacientes com alta expressão de *SLUG* podem apresentar recidiva tumoral, além de manterem o fenótipo mesenquimal¹⁰⁸.

A alta expressão de *SLUG* foi significativamente associada a uma menor sobrevida global em pacientes com câncer⁷³. Em estudo sobre a taxa de sobrevida em câncer de mama, a sobrevida de 5 anos foi significativamente menor para pacientes com alta expressão de *SLUG*, especialmente em tumores que tiveram a expressão de *E-CADERINA* alterada. Isso sugere que *SLUG* pode ser necessário para suprimir a expressão de *E-CADERINA*. Em adenocarcinomas pulmonares, a superexpressão de *SLUG* foi significativamente relacionada à recaída pós-operatória e à menor sobrevida dos pacientes⁸¹. Além disso, a análise de sobrevida global de pacientes com carcinoma colorretal mostrou que aqueles com alta expressão de *SLUG* apresentaram uma pior sobrevida, logo a expressão de *SLUG* foi um fator prognóstico independente para esses pacientes⁸⁸. Todas essas evidências sugerem que *SLUG* pode atuar como um marcador prognóstico importante para a progressão tumoral e a agressividade da doença. A expressão de *SLUG* pode, portanto, ser considerada um alvo potencial para terapias direcionadas, com o objetivo de controlar a recidiva e a metástase em pacientes com câncer.

Para investigar o papel da modulação da expressão de *SLUG* nos TCGs, foi realizado o *knockdown* de *SLUG* na linhagem de TCG de carcinoma embrionário (1777N). Com a inibição de *SLUG* houve uma tendência em aumentar a expressão de E-caderina, sugerindo o papel funcional em reprimir esse marcador epitelial⁶⁵. Nenhuma diferença foi observada nos demais marcadores mesenquimais. Esse resultado pode ser justificado por dois fatores principais. Primeiro, os experimentos foram realizados em duplicata, o que pode não fornecer uma representação estatisticamente significativa dos dados. Segundo, é possível que as células estejam apresentando um fenótipo híbrido, ou seja, expressando simultaneamente marcadores epiteliais e mesenquimais.

Simeonov et al. (2021) demonstraram, através do isolamento de clones metastáticos de câncer de pâncreas, a presença de células no estado híbrido da EMT, nas quais as células expressam tanto marcadores epiteliais quanto mesenquimais¹¹². As células nesse estado híbrido demonstram um fenótipo mais agressivo, com variações nos níveis de invasão, migração e adesão celular. Essas variações refletem as diferentes combinações de expressão de marcadores epiteliais, como EPCAM, E-CADERINA, MUC1 e queratinas, juntamente com marcadores mesenquimais, como SPARC, ZEB1, ZEB2 e VIMETINA. Os resultados indicaram

que clones de células com perfil híbrido são mais proliferativos e metastáticos do que as células predominantemente mesenquimais. Essas células híbridas estão associadas a uma maior capacidade de proliferação e formação de metástases. Entretanto, no presente estudo a capacidade de migração e invasão celular não foi alterada nas células 1777N shSLUG.

Em seguida, questionamos se a inibição do *SLUG* poderia influenciar na resposta ao tratamento à cisplatina, visto que cerca de 10-20% dos pacientes apresentam resistência a esse composto¹¹³. Dessa forma, as células 1777N shNSC e shSLUG foram tratadas com dose subletal de cisplatina e avaliadas quanto a proliferação celular. O ensaio de MTS mostrou maior proliferação nas células 1777N shSLUG comparado com a shNSC. O mesmo foi identificado no ensaio *XCELLigence*, no qual as células 1777N shSLUG apresentaram maior proliferação comparado com as células shNSC. Ainda, quando as células foram tratadas com cisplatina, a 1777N shSLUG também apresentou maior proliferação comparada com a shNSC. Esses dados sugerem que o tratamento com cisplatina não interfere na proliferação celular das shSLUG. Entretanto, as células shNSC tratadas com cisplatina apresentaram menor proliferação comparada com as não tratadas, sugerindo que o tratamento com cisplatina diminui a proliferação das células 1777N.

De uma forma geral, no presente estudo, o silenciamento de *SLUG* não alterou a capacidade de migração e invasão das células. A proliferação celular foi alterada com o silenciamento de *SLUG* independente do tratamento com cisplatina, sugerindo que o aumento da proliferação celular está relacionada com a inibição de *SLUG*. Ademais, após o tratamento com cisplatina, ambas as células (shNSC e shSLUG) apresentaram uma alteração morfológica, adquirindo um formato mais fusiforme. Esses dados sugerem que a cisplatina altera a morfologia celular independentemente da expressão de *SLUG*.

Estudos demonstram que quimioterapêuticos como paclitaxel e cisplatina podem aumentar as características tumorais nas células tumorais de pulmão^{114, 115}, ovário^{108, 116}, osteosarcoma¹¹⁷ e nasofaringe¹¹⁸, além de seus efeitos terapêuticos conhecidos¹¹⁹. Baixas doses de cisplatina podem alterar a morfologia das células tumorais, além de apresentarem diferença nos ensaios funcionais de invasão e migração^{117, 120, 121}. Além disso, estudos relatam uma diferença significativa na morfologia celular em linhagens tumorais tratadas com baixas doses de cisplatina^{116, 120}. Esses achados levantam a discussão sobre a dose de quimioterápico feita ao paciente e a associação de outros quimioterápicos^{89, 108, 115, 118, 120}.

Como alternativa para essa indução de mudança morfológica com característica fusiforme, alguns fármacos alvo-específicos estão sendo estudados.

Baribeau e colaboradores investigaram o impacto do resveratrol na EMT induzida por cisplatina no câncer de ovário. Foi relatado que as células cotratadas com resveratrol e cisplatina não apresentaram as características da EMT, pois o tratamento com resveratrol anulou a expressões de Snail induzidas por cisplatina de maneira dose-dependente. O resveratrol também bloqueou alterações morfológicas nas células e diminuiu a capacidade de migração. Esses resultados indicam que o resveratrol tem um potencial interessante para prevenir células cancerígenas induzíveis por cisplatina ¹⁰⁸.

Considerando os resultados *in silico*, foi evidenciado o impacto da expressão de *SLUG* em pacientes com TCGs. No entanto, nos resultados *in vitro*, nenhum efeito foi observado nos processos biológicos, como migração e invasão celular, em relação ao silenciamento de *SLUG*, sugerindo que esse gene não influencia tais processos. Essa discrepância nos resultados pode ser justificada pelo fato de que culturas 2D não replicam adequadamente o microambiente tumoral, destacando a importância de realizar ensaios em 3D e *in vivo*.

As células em culturas 3D crescem em uma matriz tridimensional e podem organizar-se em estruturas multicelulares, como esferoides, que imitam a organização tecidual em um organismo vivo. Essa organização é importante para estudar processos como a sinalização celular, a diferenciação e a resposta a medicamentos. Células cultivadas em 3D tendem a mostrar uma resposta a fármacos mais próxima do que seria observado *in vivo*. Por exemplo, a penetração da cisplatina em esferoides 3D pode ser limitada, simulando a dificuldade de uma droga atingir todas as partes de um tumor em um corpo humano¹²². Portanto, o ideal seria realizar estudos da EMT em TCGs utilizando culturas 3D ou ainda modelos *in vivo*.

Além das linhagens celulares, os modelos *in vivo* também são muito utilizados para estudos pré-clínicos. Um modelo selecionado para a busca de terapias personalizada é denominado modelo xenográfico, o qual pode ser derivado de linhagem celular ou células humanas. Os modelos xenográficos baseiam-se na implantação de fragmentos de células tumorais em animais imunodeficientes. Como resultado, os tumores gerados podem representar, com maior fidedignidade, a individualidade do câncer humano com o objetivo de avaliar diferentes estratégias de tratamento, baseadas em assinaturas genéticas individualizadas e para rastrear biomarcadores sanguíneos¹²³. Assim, os modelos xenográficos na oncologia personalizada, possibilitam identificar em tempo real, a melhor droga para o

tratamento de pacientes específicos, avaliar a resistência terapêutica, realizar estudo de tumores raros que não respondem à terapia padrão, personalizar a terapia de acordo com as alterações genômicas ou de expressão gênica. Além disso, possibilita a criação de bancos exclusivos de tumores transplantáveis que são extremamente valiosos para estudos prospectivos.

Vries e colaboradores estabeleceram e caracterizaram o modelo PDX derivado de pacientes com TCG testicular. O estudo demonstrou que dentre oito pacientes, três PDX foram desenvolvidos com sucesso (38%), sendo esses dois tumores de tipo histológico misto e um tumor proveniente de um paciente com doença refratária de seio endodérmico, demonstrando as histologias e genes semelhantes aos dos doadores. Esses modelos mostraram uma previsão precisa de sensibilidade a drogas para cisplatina e agora pode ser usado para estudos mecanísticos e validação pré-clínica de novas estratégias terapêuticas no câncer testicular¹²⁴.

Nosso grupo estabeleceu um modelo animal de TCG utilizando linhagem celular resistente à cisplatina (NTERA-2R). Foi demonstrado que o modelo NTERA-2R exibiu uma regulação positiva significativa na expressão de *SLUG* (Anexo A), sugerindo um papel crucial de *SLUG* na resistência a medicamentos. Dessa forma, direcionar EMT-TFs pode ser proposto como uma nova estratégia para tratar a resistência a medicamentos¹²⁵. No entanto, uma maior elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes à EMT e à resistência aos medicamentos é promissora para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas para TGCT.

7 CONCLUSÃO

Esse estudo destaca o papel do fator de transcrição *SLUG* nos TCGs, utilizando análises *in silico* e *in vitro*. As análises *in silico* revelaram que os seminomas apresentam menor expressão dos marcadores da EMT, enquanto os carcinomas embrionários e TCG misto exibem alta expressão desses marcadores, sugerindo que o perfil de expressão da EMT varia de acordo com a histologia. Ademais, o aumento da expressão de *SLUG* foi associado a uma pior sobrevida livre de progressão, sugerindo que *SLUG* pode atuar como um marcador prognóstico relevante para a progressão tumoral e a agressividade dos TCGs.

Com o objetivo de avaliar *in vitro* o papel de *SLUG* nos TCGs, realizou-se o silenciamento desse fator de transcrição na linhagem 1777N. A inibição de *SLUG* não alterou a capacidade de migração e invasão das células. Entretanto, observou-se um aumento na expressão de E-caderina, embora sem significância estatística, sugerindo uma possível reversão parcial do fenótipo mesenquimal.

A resistência a drogas é um dos processos relacionados a EMT e considerando que aproximadamente 20% dos pacientes com TCGs apresentam resistência a cisplatina, foi avaliado se a inibição de *SLUG* poderia influenciar essa resistência. As células shNSC tratadas com cisplatina exibiram menor proliferação comparada com as não tratadas, sugerindo que o tratamento com cisplatina reduz a proliferação das células 1777N. Contudo, independentemente do tratamento com cisplatina, as células 1777N shSLUG apresentaram maior capacidade proliferativa em comparação com as 1777N shNSC, indicando que o tratamento com cisplatina não interfere na proliferação celular.

Outro processo relacionado à ocorrência da EMT é a alteração na morfologia celular. Nesse sentido, foi avaliado se a inibição de *SLUG* e o tratamento com cisplatina poderiam alterar a morfologia celular. Observou-se que, após o tratamento com cisplatina, tanto as células shNSC quanto as shSLUG apresentaram alteração morfológica, adquirindo um formato mais fusiforme, sugerindo que a cisplatina altera a morfologia celular de forma independentemente da expressão de *SLUG*.

Avaliar a expressão e o papel de *SLUG* em modelos que mimetizam o comportamento tumoral em um organismo vivo é essencial para compreender melhor sua função no desenvolvimento e progressão dos TCGs, além de auxiliar na identificação de potenciais alvos

terapêuticos e na previsão da resposta ao tratamento em um contexto clínico mais próximo da realidade dos pacientes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lopes LF. *PROTOCOLO TCG GALOP* 2018.
2. Lima FCS, Oliveira JFP, Costa LM, Martins LFL, Santos MOS, Cancela MC. *Estimativa 2023-Incidência de Câncer no Brasil- INCA*.
3. Pinto MT, Eiras Martins G, Vieira AGS, Galvão JMS, de Pádua Souza C, Macedo C, et al. *Molecular Biology of Pediatric and Adult Ovarian Germ Cell Tumors: A Review*. **Cancers (Basel)**. 2023;15(11).
4. Pinto MT, Cárcano FM, Vieira AGS, Cabral ERM, Lopes LF. *Molecular Biology of Pediatric and Adult Male Germ Cell Tumors*. **Cancers (Basel)**. 2021;13(10).
5. Murray MJ, Nicholson JC. *Germ cell tumours in children and adolescents*. 2010.
6. Shaikh F, Murray MJ, Amatruda JF, Coleman N, Nicholson JC, Hale JP, et al. *Paediatric extracranial germ-cell tumours*. **Lancet Oncol**. 2016;17(4):e149-e62.
7. Dehner LP. *Gonadal and extragonadal germ cell neoplasia of childhood*. **Hum Pathol**. 1983;14(6):493-511.
8. Falavigna A, Gandara C, Ferraz FA, Saciloto B. *[Sacrococcygeal teratoma: report of three cases]*. **Arq Neuropsiquiatr**. 2004;62(2a):334-8.
9. Sharma R, Khara S, Sinha A, Yadav T. *Pure yolk sac tumor of sacrococcygeal region*. **Autops Case Rep**. 2021;11:e2021287.
10. Lin X, Wu D, Zheng N, Xia Q, Han Y. *Gonadal germ cell tumors in children: A retrospective review of a 10-year single-center experience*. **Medicine (Baltimore)**. 2017;96(26):e7386.
11. Calaminus G, Joffe J. *Germ Cell Tumors in Adolescents and Young Adults*. **Prog Tumor Res**. 2016;43:115-27.
12. Pierce JL, Frazier AL, Amatruda JF. *Pediatric Germ Cell Tumors: A Developmental Perspective*. **Adv Urol**. 2018;2018:9059382.
13. Olson TA, Murray MJ, Rodriguez-Galindo C, Nicholson JC, Billmire DF, Krailo MD, et al. *Pediatric and Adolescent Extracranial Germ Cell Tumors: The Road to Collaboration*. **J Clin Oncol**. 2015;33(27):3018-28.
14. Hawkins EP. *Pathology of germ cell tumors in children*. **Crit Rev Oncol Hematol**. 1990;10(2):165-79.
15. Okamoto M, Yamaguchi S, Ishi Y, Motegi H, Mori T, Hashimoto T, et al. *Diagnostic Capability of Cerebrospinal Fluid-Placental Alkaline Phosphatase Value in Intracranial Germ*

Cell Tumor. Oncology. 2021;99(1):23-31.

16. Lopes LF, Macedo CR, Pontes EM, Dos Santos Aguiar S, Mastellaro MJ, Melaragno R, et al. *Cisplatin and etoposide in childhood germ cell tumor: brazilian pediatric oncology society protocol GCT-91*. **J Clin Oncol**. 2009;27(8):1297-303.

17. Lopes LF, Macedo CR, Aguiar Sdos S, Barreto JH, Martins GE, Sonaglio V, et al. *Lowered Cisplatin Dose and No Bleomycin in the Treatment of Pediatric Germ Cell Tumors: Results of the GCT-99 Protocol From the Brazilian Germ Cell Pediatric Oncology Cooperative Group*. **J Clin Oncol**. 2016;34(6):603-10.

18. Lopes LF, Sonaglio V, Ribeiro KC, Schneider DT, de Camargo B. *Improvement in the outcome of children with germ cell tumors*. **Pediatr Blood Cancer**. 2008;50(2):250-3.

19. de Vries G, Rosas-Plaza X, van Vugt M, Gietema JA, de Jong S. *Testicular cancer: Determinants of cisplatin sensitivity and novel therapeutic opportunities*. **Cancer Treat Rev**. 2020;88:102054.

20. Jacobsen C, Honecker F. *Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms*. **Andrology**. 2015;3(1):111-21.

21. Dasari S, Tchounwou PB. *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. **Eur J Pharmacol**. 2014;740:364-78.

22. Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, Nuin P, Evans K, Geraci J, et al. *EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer*. **BMC Cancer**. 2012;12:91.

23. Singh A, Settleman J. *EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer*. **Oncogene**. 2010;29(34):4741-51.

24. Xu X, Zhang L, He X, Zhang P, Sun C, Xu X, et al. *TGF- β plays a vital role in triple-negative breast cancer (TNBC) drug-resistance through regulating stemness, EMT and apoptosis*. **Biochem Biophys Res Commun**. 2018;502(1):160-5.

25. Kalluri R. *EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells*. **J Clin Invest**. 2009;119(6):1417-9.

26. Kalluri R, Weinberg RA. *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. **J Clin Invest**. 2009;119(6):1420-8.

27. Lachat C, Peixoto P, Hervouet E. *Epithelial to Mesenchymal Transition History: From Embryonic Development to Cancers*. **Biomolecules**. 2021;11(6).

28. Hay ED, Gurdon JB. *Fine structure of the nucleolus in normal and mutant Xenopus embryos*. **J Cell Sci**. 1967;2(2):151-62.

29. Trelstad RL, Hay ED, Revel JD. *Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo*. **Dev Biol**. 1967;16(1):78-106.
30. Flaxman BA, Revel JP, Hay ED. *Tight junctions between contact-inhibited cells in vitro*. **Exp Cell Res**. 1969;58(2):438-43.
31. Dulbecco R, Henahan M, Bowman M, Okada S, Battifora H, Unger M. *Generation of fibroblast-like cells from cloned epithelial mammary cells in vitro: a possible new cell type*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1981;78(4):2345-9.
32. Greenburg G, Hay ED. *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. **J Cell Biol**. 1982;95(1):333-9.
33. Potts JD, Dagle JM, Walder JA, Weeks DL, Runyan RB. *Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor beta 3*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1991;88(4):1516-20.
34. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, et al. *Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism*. **Mol Biol Cell**. 2001;12(1):27-36.
35. Kurisaki A, Kose S, Yoneda Y, Heldin CH, Moustakas A. *Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner*. **Mol Biol Cell**. 2001;12(4):1079-91.
36. Sugrue SP, Hay ED. *The identification of extracellular matrix (ECM) binding sites on the basal surface of embryonic corneal epithelium and the effect of ECM binding on epithelial collagen production*. **J Cell Biol**. 1986;102(5):1907-16.
37. Dongre A, Weinberg RA. *New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2019;20(2):69-84.
38. Deshmukh AP, Vasaikar SV, Tomczak K, Tripathi S, den Hollander P, Arslan E, et al. *Identification of EMT signaling cross-talk and gene regulatory networks by single-cell RNA sequencing*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2021;118(19).
39. Grasset EM, Dunworth M, Sharma G, Loth M, Tandurella J, Cimino-Mathews A, et al. *Triple-negative breast cancer metastasis involves complex epithelial-mesenchymal transition dynamics and requires vimentin*. **Sci Transl Med**. 2022;14(656):eabn7571.
40. Sinha D, Saha P, Samanta A, Bishayee A. *Emerging Concepts of Hybrid Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression*. **Biomolecules**. 2020;10(11).
41. Yang J, Antin P, Berx G, Blanpain C, Brabletz T, Bronner M, et al. *Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2020;21(6):341-52.

42. Nieto MA. *The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease.* **Annu Rev Cell Dev Biol.** 2011;27:347-76.
43. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.* **Cell.** 2009;139(5):871-90.
44. Moreira C. *Tecido epitelial animal.* **Revista de Ciência Elementar.** 2015;3(1).
45. Zisis T, Brückner DB, Brandstätter T, Siow WX, d'Alessandro J, Vollmar AM, et al. *Disentangling cadherin-mediated cell-cell interactions in collective cancer cell migration.* **Biophys J.** 2022;121(1):44-60.
46. Radisky DC. *Epithelial-mesenchymal transition.* **J Cell Sci.** 2005;118(Pt 19):4325-6.
47. Ouyang G, Wang Z, Fang X, Liu J, Yang CJ. *Molecular signaling of the epithelial to mesenchymal transition in generating and maintaining cancer stem cells.* **Cell Mol Life Sci.** 2010;67(15):2605-18.
48. Sun X, Xiao H, Li S, Chen R, Lin Z, Yang Y, et al. *Connexin32 ameliorates epithelial-to-mesenchymal-transition in diabetic renal tubular via inhibiting NOX4.* **Pharmacol Res.** 2022;176:106084.
49. Zhiwen X, Yongqing Z, Wenlan S, Shan H, Bangmin H, Juntao J, et al. *Dibutyl phthalate induces epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells via the Ang II/AMPK α 2/Cx43 signaling pathway.* **Toxicology.** 2023;494:153584.
50. Li Y, Acosta FM, Jiang JX. *Gap Junctions or Hemichannel-Dependent and Independent Roles of Connexins in Fibrosis, Epithelial-Mesenchymal Transitions, and Wound Healing.* **Biomolecules.** 2023;13(12).
51. To KKW, Cho WCS. *Mesenchymal Epithelial Transition (MET): A Key Player in Chemotherapy Resistance and an Emerging Target for Potentiating Cancer Immunotherapy.* **Curr Cancer Drug Targets.** 2022;22(4):269-85.
52. Debnath P, Huirem RS, Dutta P, Palchaudhuri S. *Epithelial-mesenchymal transition and its transcription factors.* **Biosci Rep.** 2022;42(1).
53. Jonckheere S, Adams J, De Groote D, Campbell K, Berx G, Goossens S. *Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) as a Therapeutic Target.* **Cells Tissues Organs.** 2022;211(2):157-82.
54. Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR, Rustgi AK. *EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis.* **Trends Cell Biol.** 2020;30(10):764-76.
55. Matsuno Y, Coelho AL, Jarai G, Westwick J, Hogaboam CM. *Notch signaling mediates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through the induction of Snai1.* **Int J**

Biochem Cell Biol. 2012;44(5):776-89.

56. Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, Pierdomenico SD, Trubiani O, Pizzicannella J, et al. *Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis.* **Cells.** 2021;10(7).

57. Linsdell P. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): Making an ion channel out of an active transporter structure.* **Channels (Austin).** 2018;12(1):284-90.

58. Tennakoon AH, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. *Pathogenesis of Type 2 Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Renal and Hepatic Fibrosis.* **J Clin Med.** 2015;5(1).

59. Batarfi WA, Mohd Yunus MH, Hamid AA. *The Effect of Hydroxytyrosol in Type II Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Skin Wound Healing.* **Molecules.** 2023;28(6).

60. Xiong R, Geng B, Jiang W, Hu Y, Hu Z, Hao B, et al. *Histone deacetylase 3 deletion in alveolar type 2 epithelial cells prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis.* **Clin Epigenetics.** 2023;15(1):182.

61. Alves CC, Carneiro F, Hoefler H, Becker KF. *Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers.* **Front Biosci (Landmark Ed).** 2009;14(8):3035-50.

62. Côme C, Arnoux V, Bibeau F, Savagner P. *Roles of the transcription factors snail and slug during mammary morphogenesis and breast carcinoma progression.* **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** 2004;9(2):183-93.

63. Dhasarathy A, Phadke D, Mav D, Shah RR, Wade PA. *The transcription factors Snail and Slug activate the transforming growth factor-beta signaling pathway in breast cancer.* **PLoS One.** 2011;6(10):e26514.

64. Fenouille N, Tichet M, Dufies M, Pottier A, Mogha A, Soo JK, et al. *The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion.* **PLoS One.** 2012;7(7):e40378.

65. Sheng L, Zhang S, Xu H. *Effect of Slug-Mediated Down-Regulation of E-Cadherin on Invasiveness and Metastasis of Anaplastic Thyroid Cancer Cells.* **Med Sci Monit.** 2017;23:138-43.

66. Lu W, Kang Y. *Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis.* **Dev Cell.** 2019;49(3):361-74.

67. Du B, Shim JS. *Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer.* **Molecules.** 2016;21(7).

68. Yen WC, Fischer MM, Axelrod F, Bond C, Cain J, Cancilla B, et al. *Targeting Notch signaling with a Notch2/Notch3 antagonist (tarextumab) inhibits tumor growth and decreases*

tumor-initiating cell frequency. **Clin Cancer Res.** 2015;21(9):2084-95.

69. Herbertz S, Sawyer JS, Stauber AJ, Gueorguieva I, Driscoll KE, Estrem ST, et al. *Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway.* **Drug Des Devel Ther.** 2015;9:4479-99.

70. Le Bras GF, Taubenslag KJ, Andl CD. *The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression.* **Cell Adh Migr.** 2012;6(4):365-73.

71. Son H, Moon A. *Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion.* **Toxicol Res.** 2010;26(4):245-52.

72. Guo Q, Ning F, Fang R, Wang HS, Zhang G, Quan MY, et al. *Endogenous Nodal promotes melanoma undergoing epithelial-mesenchymal transition via Snail and Slug in vitro and in vivo.* **Am J Cancer Res.** 2015;5(6):2098-112.

73. Shirley SH, Greene VR, Duncan LM, Torres Cabala CA, Grimm EA, Kusewitt DF. *Slug expression during melanoma progression.* **Am J Pathol.** 2012;180(6):2479-89.

74. Kimura ET, Matsuo SE, Ricarte-Filho JC. *[TGFBeta, activin and SMAD signalling in thyroid cancer].* **Arq Bras Endocrinol Metabol.** 2007;51(5):683-9.

75. Paula LC, Zen VL, Czepielewski MA. *[Granulosa-stromal tumor of the ovary: a case of mixed germ cell-cord stromal tumor of the ovary with endocrinological considerations].* **Arq Bras Endocrinol Metabol.** 2005;49(5):776-83.

76. Solheim O, Førstund M, Tropé CG, Kraggerud SM, Nesland JM, Davidson B. *Epithelial-mesenchymal transition markers in malignant ovarian germ cell tumors.* **Apmis.** 2017;125(9):781-6.

77. Xu M, Li J, Wang X, Meng S, Shen J, Wang S, et al. *MiR-22 suppresses epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer by inhibiting Snail and MAPK1/Slug/vimentin feedback loop.* **Cell Death Dis.** 2018;9(2):209.

78. Han YH, Kee JY, Hong SH. *Rosmarinic Acid Activates AMPK to Inhibit Metastasis of Colorectal Cancer.* **Front Pharmacol.** 2018;9:68.

79. Ribeiro PS, T. . *Papel da desregulação da via Wnt-β-catenina-TCF no desenvolvimento de cancro colorretal.*

80. Mahmood MQ, Ward C, Muller HK, Sohal SS, Walters EH. *Epithelial mesenchymal transition (EMT) and non-small cell lung cancer (NSCLC): a mutual association with airway disease.* **Med Oncol.** 2017;34(3):45.

81. Shih JY, Tsai MF, Chang TH, Chang YL, Yuan A, Yu CJ, et al. *Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma.*

Clin Cancer Res. 2005;11(22):8070-8.

82. Heldin CH, Vanlandewijck M, Moustakas A. *Regulation of EMT by TGF β in cancer.* **FEBS Lett.** 2012;586(14):1959-70.

83. Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P. *TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells.* **J Cell Sci.** 1999;112 (Pt 24):4557-68.

84. Espinoza I, Miele L. *Deadly crosstalk: Notch signaling at the intersection of EMT and cancer stem cells.* **Cancer Lett.** 2013;341(1):41-5.

85. Wang Z, Li Y, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Azmi AS, et al. *Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway.* **Cancer Res.** 2009;69(6):2400-7.

86. Yingling JM, McMillen WT, Yan L, Huang H, Sawyer JS, Graff J, et al. *Preclinical assessment of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a first-in-class transforming growth factor- β receptor type I inhibitor.* **Oncotarget.** 2018;9(6):6659-77.

87. Balcik-Ercin P, Cayrefourcq L, Soundararajan R, Mani SA, Alix-Panabières C. *Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Circulating Tumor Cell Lines Sequentially Derived from a Patient with Colorectal Cancer.* **Cancers (Basel).** 2021;13(21).

88. Tian H, Chen Z, Zhu X, Ou Q, Wang Z, Wu B, et al. *Induced retinal pigment epithelial cells with anti-epithelial-to-mesenchymal transition ability delay retinal degeneration.* **iScience.** 2022;25(10):105050.

89. Liu W, Han X, Li Q, Sun L, Wang J. *Iguratimod ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting the EMT process and NLRP3 inflammasome activation.* **Biomed Pharmacother.** 2022;153:113460.

90. Wirsik NM, Ehlers J, Mäder L, Ilina EI, Blank AE, Grote A, et al. *TGF- β activates pericytes via induction of the epithelial-to-mesenchymal transition protein SLUG in glioblastoma.* **Neuropathol Appl Neurobiol.** 2021;47(6):768-80.

91. Taipale J, Beachy PA. *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer.* **Nature.** 2001;411(6835):349-54.

92. Covey TM, Kaur S, Tan Ong T, Proffitt KD, Wu Y, Tan P, et al. *PORCN moonlights in a Wnt-independent pathway that regulates cancer cell proliferation.* **PLoS One.** 2012;7(4):e34532.

93. Chen S, Yuan X, Xu H, Yi M, Liu S, Wen F. *WNT974 Inhibits Proliferation, Induces Apoptosis, and Enhances Chemosensitivity to Doxorubicin in Lymphoma Cells by Inhibiting Wnt/ β -Catenin Signaling.* **Med Sci Monit.** 2020;26:e923799.

94. Boone JD, Arend RC, Johnston BE, Cooper SJ, Gilchrist SA, Oelschlager DK, et al. *Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in primary ovarian cancer with the porcupine inhibitor WNT974*. **Lab Invest**. 2016;96(2):249-59.
95. Al Moustafa AE, Achkhar A, Yasmeen A. *EGF-receptor signaling and epithelial-mesenchymal transition in human carcinomas*. **Front Biosci (Schol Ed)**. 2012;4(2):671-84.
96. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. **J Cell Biol**. 2006;172(7):973-81.
97. Cui H, Huang J, Lei Y, Chen Q, Hu Z, Niu J, et al. *Design and synthesis of dual inhibitors targeting snail and histone deacetylase for the treatment of solid tumour cancer*. **Eur J Med Chem**. 2022;229:114082.
98. Li HM, Bi YR, Li Y, Fu R, Lv WC, Jiang N, et al. *A potent CBP/p300-Snail interaction inhibitor suppresses tumor growth and metastasis in wild-type p53-expressing cancer*. **Sci Adv**. 2020;6(17):eaaw8500.
99. Cmero M, Kurganovs NJ, Stuchbery R, McCoy P, Grima C, Ngyuen A, et al. *Loss of SNAI2 in Prostate Cancer Correlates With Clinical Response to Androgen Deprivation Therapy*. **JCO Precis Oncol**. 2021;5.
100. De Las Rivas J, Brozovic A, Izraely S, Casas-Pais A, Witz IP, Figueroa A. *Cancer drug resistance induced by EMT: novel therapeutic strategies*. **Arch Toxicol**. 2021;95(7):2279-97.
101. Brasseur K, Gévry N, Asselin E. *Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers*. **Oncotarget**. 2017;8(3):4008-42.
102. Wang J, Wei Q, Wang X, Tang S, Liu H, Zhang F, et al. *Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance*. **Genes Dis**. 2016;3(1):3-6.
103. Smith BN, Bhowmick NA. *Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance*. **J Clin Med**. 2016;5(2).
104. Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, Chen ZS. *Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance*. **Chin J Cancer**. 2012;31(2):58-72.
105. Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, Wolf DM, Lazar AJ, Drill E, et al. *Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer*. **Cell**. 2018;173(2):291-304.e6.
106. Zhou W, Gross KM, Kuperwasser C. *Molecular regulation of Snai2 in development and disease*. **J Cell Sci**. 2019;132(23).
107. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. *The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis*. **Curr Cancer Drug Targets**. 2013;13(9):963-72.

108. Baribeau S, Chaudhry P, Parent S, Asselin É. *Resveratrol inhibits cisplatin-induced epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cell lines*. **PLoS One**. 2014;9(1):e86987.
109. Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG. *Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer*. **Clin Cancer Res**. 2007;13(16):4769-76.
110. Hotz HG, Hotz B, Buhr HJ. *Genes associated with epithelial-mesenchymal transition: possible therapeutic targets in ductal pancreatic adenocarcinoma?* **Anticancer Agents Med Chem**. 2011;11(5):448-54.
111. Chen JG, Wang JQ, Peng TW, Chen ZS, Zhao SC. *Construction and Validation of a Nomogram for Predicting Progression- Free Survival in Patients with Early-Stage Testicular Germ Cell Tumor*. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**. 2021;16(1):44-53.
112. Simeonov KP, Byrns CN, Clark ML, Norgard RJ, Martin B, Stanger BZ, et al. *Single-cell lineage tracing of metastatic cancer reveals selection of hybrid EMT states*. **Cancer Cell**. 2021;39(8):1150-62.e9.
113. Galvez-Carvajal L, Sanchez-Muñoz A, Ribelles N, Saez M, Baena J, Ruiz S, et al. *Targeted treatment approaches in refractory germ cell tumors*. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2019;143:130-8.
114. Han ML, Zhao YF, Tan CH, Xiong YJ, Wang WJ, Wu F, et al. *Cathepsin L upregulation-induced EMT phenotype is associated with the acquisition of cisplatin or paclitaxel resistance in A549 cells*. **Acta Pharmacol Sin**. 2016;37(12):1606-22.
115. Zhang R, Li S, Lan J, Li C, Du X, Dong W, et al. *CNTN-1 Upregulation Induced by Low-Dose Cisplatin Promotes Malignant Progression of Lung Adenocarcinoma Cells via Activation of Epithelial-Mesenchymal Transition*. **Front Genet**. 2022;13:891665.
116. Xiong X, Arvizo RR, Saha S, Robertson DJ, McMeekin S, Bhattacharya R, et al. *Sensitization of ovarian cancer cells to cisplatin by gold nanoparticles*. **Oncotarget**. 2014;5(15):6453-65.
117. Fang S, Yu L, Mei H, Yang J, Gao T, Cheng A, et al. *Cisplatin promotes mesenchymal-like characteristics in osteosarcoma through Snail*. **Oncol Lett**. 2016;12(6):5007-14.
118. Su Z, Li G, Liu C, Ren S, Deng T, Zhang S, et al. *Autophagy inhibition impairs the epithelial-mesenchymal transition and enhances cisplatin sensitivity in nasopharyngeal carcinoma*. **Oncol Lett**. 2017;13(6):4147-54.
119. Chen X, Lv Y, Xu K, Wang X, Zhao Y, Li J, et al. *DCBLD2 Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition-Induced Metastasis by Cisplatin in Lung Adenocarcinoma*. **Cancers (Basel)**. 2021;13(6).
120. Dönmez Çakıl Y, Akbulut Z, Gülhan Aktaş R, Gunes Ozunal Z. *Low-dose cisplatin*

exposure and SNAIL, Vimentin, E-cadherin expression in HEPG2 cell line. International Journal of Medical and Surgical Sciences. 2022;1-9.

121. Imatsuji S, Ujie Y, Odake H, Imoto M, Itoh S, Tashiro E. *Cisplatin-induced activation of TGF- β signaling contributes to drug resistance.* **Oncol Res.** 2023;32(1):139-50.
122. Suarez-Martinez E, Suazo-Sanchez I, Celis-Romero M, Carnero A. *3D and organoid culture in research: physiology, hereditary genetic diseases and cancer.* **Cell Biosci.** 2022;12(1):39.
123. Kohnken R, Porcu P, Mishra A. *Overview of the Use of Murine Models in Leukemia and Lymphoma Research.* **Front Oncol.** 2017;7:22.
124. de Vries G, Rosas-Plaza X, Meersma GJ, Leeuwenburgh VC, Kok K, Suurmeijer AJH, et al. *Establishment and characterisation of testicular cancer patient-derived xenograft models for preclinical evaluation of novel therapeutic strategies.* **Sci Rep.** 2020;10(1):18938.
125. Saxena M, Stephens MA, Pathak H, Rangarajan A. *Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters.* **Cell Death Dis.** 2011;2(7):e179.

ANEXOS

Anexo A. Termo de aceite do artigo científico na revista *Molecular Medicine Reports*, seguido do artigo científico na íntegra.

August 02, 2024

Our reference: 307314

Journal: Molecular Medicine Reports

Title: Cisplatin-resistant germ cell tumors models: an exploration of epithelial-mesenchymal transition regulator SLUG

Authors: Miss Ingridy Izabella Vieira Cardoso, Dr Marcela Nunes Rosa, Dr Daniel Antunes Moreno, Dr Leticia Maria Barbosa Tufi, Miss Lorryne Pereira Ramos, Dr Larissa A. Bourdeth Pereira, Miss Janaina Mello Soares Galvão, Miss Isabela Cristiane Tosi, Mr André van Helvoort Lengert, Dr Marcelo Cavalcanti da Cruz, Dr Silvia Aparecida Teixeira, Dr Rui Manuel Reis, Dr Luiz Fernando Lopes, Dr Mariana Tomazini Pinto

Dear MARIANA PINTO,

Thank you for your submission. The manuscript 'Cisplatin-resistant germ cell tumors models: an exploration of epithelial-mesenchymal transition regulator SLUG' by Cardoso et al was provisionally accepted for publication in Molecular Medicine Reports on June 27, 2024. The submission should be considered to be formally accepted upon the receipt of proofs.

An author PDF file will be provided on publication.

Yours Sincerely,

Demetrios A. Spandidos

Cisplatin-resistant germ cell tumor models: An exploration of the epithelial-mesenchymal transition regulator *SLUG*

INGRIDY IZABELLA VIEIRA CARDOSO¹, MARCELA NUNES ROSA¹, DANIEL ANTUNES MORENO¹, LETÍCIA MARIA BARBOSA TUFI¹, LORRAYNE PEREIRA RAMOS¹, LARISSA ALESSANDRA BOURDETH PEREIRA¹, LENILSON SILVA¹, JANAINA MELLO SOARES GALVÃO¹, ISABELA CRISTIANE TOSI¹, ANDRÉ VAN HELVOORT LENGERT¹, MARCELO CAVALCANTI DA CRUZ², SILVIA APARECIDA TEIXEIRA¹, RUI MANUEL REIS^{1,3}, LUIZ FERNANDO LOPES⁴ and MARIANA TOMAZINI PINTO^{1,4}

¹Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo 14784400, Brazil; ²Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo 14784400, Brazil; ³Life and Health Sciences Research Institute Medical School, University of Minho, 4710057 Braga, Portugal; ⁴Barretos Children's Cancer Hospital, Hospital de Amor, Barretos, São Paulo 14784400, Brazil

Correspondence to: Dr Mariana Tomazini Pinto, Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, 1332 Antenor Duarte Villela Street, Barretos, São Paulo 14784400, Brazil

E-mail: mariana.pinto49@edu.hospitaldeamor.com.br

Key words: epithelial-mesenchymal transition, SLUG, germ cell tumor, cisplatin resistance

Running title: CARDOSO *et al*: CISPLATIN RESISTANCE: EXPLORING THE ROLE OF SLUG IN GERM CELL TUMORS

Abstract. Germ cell tumors (GCTs) constitute diverse neoplasms arising in the gonads or extragonadal locations. Testicular GCTs (TGCTs) are the predominant solid tumors in adolescents and young men. Despite cisplatin serving as the primary therapeutic intervention for TGCTs, 10-20% of patients with advanced disease demonstrate resistance to cisplatin-based chemotherapy, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a potential contributor to this resistance. EMT is regulated by various factors, including the snail family transcriptional repressor 2 (*SLUG*) transcriptional factor, and, to the best of our knowledge, remains

unexplored within TGCTs. Therefore, the present study investigated the EMT transcription factor *SLUG* in TGCTs. *In silico* analyses were performed to investigate the expression of EMT markers in TGCTs. In addition, a cisplatin-resistant model for TGCTs was developed using the NTERA-2 cell line, and a mouse model was also established. Subsequently, EMT was assessed both *in vitro* and *in vivo* within the cisplatin-resistant models using quantitative PCR and western blot analyses. The results of the *in silico* analysis showed that the different histologies exhibited distinct expression profiles for EMT markers. Seminomas exhibited a lower expression of EMT markers, whereas embryonal carcinomas and mixed GCT demonstrated high expression. Notably, patients with lower *SLUG* expression had longer median progression-free survival (46.4 months vs. 28.0 months, $P=0.022$). In the *in vitro* analysis, EMT-associated genes [fibronectin; vimentin (*VIM*); actin, $\alpha 2$, smooth muscle; collagen type I $\alpha 1$; transforming growth factor- $\beta 1$; and *SLUG*] were upregulated in the cisplatin-resistant NTERA-2 (NTERA-2R) cell line after 72 h of cisplatin treatment. Consistent with this finding, the NTERA-2R mouse model demonstrated a significant upregulation in the expression levels of *VIM* and *SLUG*. In conclusion, the present findings suggested that *SLUG* may serve a crucial role in connecting EMT with the development of cisplatin resistance, and targeting *SLUG* may be a putative therapeutic strategy to mitigate cisplatin resistance.

Introduction

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) results in the loss of epithelial features and the gain of a mesenchymal phenotype in cells; this is essential during embryonic development and in some diseases, such as cancer (1,2). EMT is executed by EMT-activating transcription factors (EMT-TFs), mainly snail family transcriptional repressor 1 (*SNAIL*) and snail family transcriptional repressor 2 (*SLUG*). Over the last decade, these EMT-TFs have demonstrated crucial roles in all stages of cancer progression, including primary tumor growth, invasion, dissemination, metastasis, cancer stem cell properties and resistance to therapy (3-5). Several studies have described the roles of EMT programs in various types of cancer (6-8); however, more information is needed regarding germ cell tumors (GCTs).

GCTs comprise a heterogeneous group of neoplasms occurring in the gonads (ovaries or testes) or at extragonadal locations (9). Testicular GCTs (TGCTs) are the most common solid tumors in adolescents and young men (10), and are organized into two histological groups: Seminoma (SE) and non-seminoma GCTs (NSGCTs). NSGCTs are subdivided into the following categories: Embryonal carcinoma, yolk sac tumor, teratoma, choriocarcinoma and mixed NSGCT, in which more than one histological type occurs (11). Cisplatin is the most

commonly used drug in the treatment of TGCTs (12,13); however, 10-20% of patients with advanced disease demonstrate resistance to cisplatin-based chemotherapy (14). The resistance of TGCT to cisplatin chemotherapy may be related to different molecular mechanisms, including EMT. Evidence has suggested that the EMT process may serve an important role in the development of chemoresistance by altering the expression of essential genes involved in cell cycle regulation, drug transport and apoptosis (15–17).

SLUG expression has emerged as a valuable prognostic indicator for various types of cancer. In gastric cancer, its utility extends to predicting lymph node metastasis and influencing overall patient survival (18). SLUG also has been implicated in tumor metastasis and angiogenesis in ovarian cancer (19). Furthermore, elevated SLUG expression in non-small cell lung cancer has been significantly linked to an increased rate of cancer recurrence and diminished overall survival (20). Despite these extensive associations in various malignancies, there remains a paucity of studies exploring EMT in TGCT. Therefore, the present study aimed to investigate the EMT transcription factor *SLUG* in TGCTs.

Materials and methods

In silico data analyses. Patient clinical and pathological information, along with gene expression data, were obtained from the Testicular Germ Cell Tumors RNA sequencing dataset from The Cancer Genome Atlas (TCGA Pan-Cancer Atlas; TCGA-TGCT dataset) (21) available on the cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>). The present study focused on patients diagnosed with SE, embryonal carcinoma and mixed NSGCTs.

The expression of EMT-related genes in these histological types was examined to explore their potential role in TGCT. Using the z-score transformed data of the EMT-related genes, a heatmap was generated to visually analyze the gene expression patterns, created with the ComplexHeatmap package version 2.16.0 (22). Patients with available information on progression-free survival (PFS) in 5 years, as well as gene expression data for *SNAIL* (also referred to as *SNAIL*) and *SNAIL2* (also referred to as *SLUG*) obtained from RNA sequencing assays (Illumina HiSeq_RNASeqV2), were selected. The present analysis included 89 TGCT cases with both survival and mRNA expression information. Patients were classified into low and high expression groups according to the median value of *SNAIL* and *SLUG* expression.

Cell culture. Human NTERA-2 clone D1 [NT2/D1] and JEG-3 cells were used in the present study. NTERA-2 clone D1 (cat. no. 01071221, RRID: CVCL_3407; European Collection of Authenticated Cell Cultures) is a cell line derived from a human testicular embryonal

carcinoma, and the JEG-3 cell line is derived from a human placenta choriocarcinoma (cat. no. HTB-36, RRID: CVCL_0363; American Type Culture Collection). Cells were cultured according to the supplier's instructions in Dulbecco's modified Eagle's medium (Thermo Fisher Scientific, Inc.) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Corning, Inc.), 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (Corning, Inc.) at 37°C in 5% CO₂. Our group previously published a study in which a cisplatin-resistant cell model was developed by growing the NTERA-2 clone D1 cell line in increasing concentrations of cisplatin over a period of ~8 months (23). This model was utilized in the current study and the parental NTERA-2 (NTERA-2P) and cisplatin-resistant NTERA-2 (NTERA-2R) cell lines were cultured in the same conditions. Cisplatin (cat. no. PHR1624; Sigma-Aldrich; Merck KgaA) was prepared at 5 mM in 0.9% NaCl. NTERA-2 cells were treated with the IC₅₀ dose of cisplatin and were collected after 72 h for gene expression analysis. All cell lines were mycoplasma-free (MycoAlert Mycoplasma Detection Kit; Lonza Group Ltd.; tested monthly) and were authenticated by short tandem-repeat analysis at the Barretos Cancer Hospital facilities (Barretos, Brazil) (24). For gene expression characterization of JEG-3 and NTERA-2P cells, cells were not treated. For gene expression comparisons between NTERA-2P and NTERA-2R cells, cells were treated with the IC₅₀ of cisplatin (0.25 µM for NTERA-2P cells and 5 µM for NTERA-2R cells) and were collected after 72 h.

RNA isolation and reverse transcription-quantitative PCR. Total RNA was extracted from cells or frozen mouse tumor tissues using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), and RT was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.), according to the manufacturer's protocol. Gene expression analysis was performed by qPCR (thermocycling conditions: 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min) using TaqMan[®] Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Inc.) and a QuantStudio 6 real-time system (Thermo Fisher Scientific, Inc.) for the following genes: Cadherin 1 (*CDH1*; assay ID Hs00170423_m1), cadherin 2 (*CDH2*; assay ID Hs00983056_m1), fibronectin (*FN1*; assay ID Hs01549976_m1), vimentin (*VIM*; assay ID Hs00185584_m1), actin, α 2, smooth muscle (*ACTA2*; assay ID Hs00909449_m1), collagen type I α 1 (*COL1A1*; assay ID Hs00164004_m1), transforming growth factor- β 1 (*TGF- β* ; assay ID Hs00998133_m1), *SNAIL* (assay ID Hs00195591_m1) and *SLUG* (assay ID Hs00950344_m1). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (cat. no. 4310884E) was used to normalize the mRNA amount for each sample.

The relative expression unit (REU) method ($REU = 10.000/2^{\Delta Ct}$) was used to calculate the REUs, and the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method was used to calculate the relative gene expression levels (25).

Western blot analysis. Total proteins were extracted from cells using RIPA buffer (Sigma-Aldrich; Merck KGaA), including 10% protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich; Merck KGaA). After 15 min on ice, samples were centrifuged at 13,000 x g for 30 min at 4°C, the supernatant was collected, and protein concentration was quantified using the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Proteins (50 µg) were then denatured at 95°C for 5 min in 4X Laemmli buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc.), separated by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Protran; Cytiva). Membranes were blocked in 5% milk powder in TBS/0.1% Tween (pH, 7.6) for 1 h at room temperature and were then incubated with the following primary antibodies overnight at 4°C: CDH1 (1:500; cat. no. 3195S), CDH2 (1:500; cat. no. 4061S), and VIM (1:1,000; cat. no. 5741S), all from Cell Signaling Technology, Inc. β -actin was used as a loading control (1:1,000; cat. no. 8457; Cell Signaling Technology, Inc.). Subsequently, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5,000; cat. no. 7074P2; Cell Signaling Technology, Inc.) for 1 h at room temperature. The blots were detected by chemiluminescence using either SignalFire ECL Reagent (Cell Signaling Technology, Inc.) or SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific, Inc.). The chemiluminescent signal was detected using ImageQuant LAS 4000 mini (Cytiva), and densitometric analysis was performed using ImageJ software, version 1.4 (National Institutes of Health).

Animals. Athymic nude mice (*Mus musculus*) were purchased from Jackson Laboratory and were housed in microisolator cages under specific pathogen-free conditions at a temperature of 21°C and a humidity of 55% at the Animal Facility, Barretos Cancer Hospital (26). Mice received *ad libitum* access to sterile food and water, and were maintained under a 12-h light/dark cycle. All animal experiments were performed according to protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) following Brazil's National Council for Animal Experimentation Control guidelines (law no. 11,794 of October 8, 2008; decree 6,899 of June 15, 2009). All animal experiments were approved by the IACUC at Barretos Cancer Hospital (approval no. 010/2020).

For experiments, 1×10^6 NTERA-2P or NTERA-2R cells were resuspended in 100 µl HBSS (HyClone; Cytiva)/Matrigel (Corning, Inc.) (1:1 volume). The cells were subcutaneously

engrafted into the right flank of 6-8-week-old male mice (n=3 mice/group; weight, ~28 g). The total number of animals was 6 (3 animals per group; two groups). The animals were monitored for signs of morbidity, and symptoms such as weight loss exceeding 20% and difficulty walking or eating were used as criteria to halt the experiments and sacrifice the mice. Notably, in the present study, it was not necessary to interrupt the experiments for any reason. The weights of the mice were recorded twice weekly and tumor volume (V) was measured with a caliper and calculated using the formula: $V = (D \times d)^2 \times 0.5$ where D represents the longest diameter and d the smallest diameter of the tumor. The endpoint for euthanizing the animals was when the tumor volume reached ~2,000 mm³. The mice were euthanized using an intraperitoneal injection of a combination of ketamine (300 mg/kg) and xylazine (30 mg/kg). Subsequently, tumors were aseptically excised, and a portion was subjected to formalin fixation for histological analysis, whereas another portion was rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for RNA extraction.

The frozen tumor was macerated using a pestle and mortar, and the resulting material was subsequently transferred to a microtube where, 1.5 ml TRIzol was added. After homogenization, RNA extraction proceeded according to the manufacturer's instructions, and RNA quantification was conducted using a Nanodrop instrument (Thermo Fisher Scientific, Inc.). RT-qPCR was performed as aforementioned.

For histological analysis, tissues were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde at 25°C for 24 h. Sections were then dehydrated, embedded in paraffin and cut into 4-μm slices using a microtome. These sections were stained at room temperature with hematoxylin (ready-to-use; cat. no. CS70030-2; Dako; Agilent Technologies, Inc.) and eosin (ready-to-use; cat. no. CS 70130-2; Dako; Agilent Technologies, Inc.) using an automated platform and subsequently reviewed by a pathologist under a light microscope. To assess cell proliferation in NTERA-2P and NTERA-2R tumors, immunohistochemical staining of Ki-67 (ready-to-use; cat. no. IR626; Dako; Agilent Technologies, Inc.) was conducted. Briefly, the tissue sections were deparaffinized (75°C for 4 min) and subjected to antigen retrieval in conditioning solution at 95°C for 64 min. Primary antibody (ki-67) was added, and detection was performed using the Ultra View Universal DAB Detection kit (cat. no. 760-500; Roche Diagnostics). These procedures (H&E and ki-67 staining) were conducted using the Ventana BenchMark Ultra[®] automated platform (Roche Tissue Diagnostics) at the Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital. The experiments were performed using the automated platform and details such as the dilution and percentage of the antibodies and reagents were not provided by the manufacturers. Slides were scanned using an Aperio CS2 scanner (Leica Microsystems, Inc.).

Statistical analysis. All data are presented as the mean $\pm$ standard deviation. Unpaired Student's t-test and non-parametric Mann-Whitney two-tailed test were used to compare two groups. One-way ANOVA was used to compare multiple treatment groups, followed by Tukey's multiple comparisons test. All statistical tests were performed using GraphPad Prism (version 8.0.2; Dotmatics) software. IBM SPSS Statistics version 25 software (IBM Corp.) was used for survival analysis, which was performed using the Kaplan-Meier method and log-rank test. For multiple comparisons, Bonferroni correction was applied following log-rank test. $P \leq 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

In silico analysis. To evaluate EMT-associated genes, the online tool cBioPortal was used. The dataset from the Testicular Germ Cell Cancer study previously reported by Shen et al (21) was analyzed, which included 89 patients with TGCT, including 49 SEs, 29 mixed tumors and 11 embryonal carcinomas. The expression levels of EMT-associated genes were evaluated (Fig. 1) and the patients were shown to be divided into two main groups according to their histology: i) Embryonal carcinoma and mixed GCT, and ii) SE (Fig. 1A). Three patients with mixed GCT were classified in the SE group, which can be explained by the presence of an SE component (TCGA-2G-AAH3-01: 60% teratoma mature and immature, 35% SE, yolk sac tumor 5%; TCGA-2G-AAH0-01: 95% SE and 5% yolk sac tumor; TCGA-SN- A6IS-01: 85% SE and 15% teratoma mature). For TCGA-2G-AAH3-01, despite teratoma being the predominant component, it was classified in the SE group due to the significant presence of seminoma (35%), as teratomas were not classified separately. The distinct histologies exhibited disparate expression profiles for EMT markers. The SE group exhibited lower expression of EMT markers, whereas the embryonal carcinoma and mixed GCT group showed high expression of EMT markers, suggesting that the profile of EMT markers varies according to histology. A second analysis was performed, considering only EMT-TFs (Fig. 1B). Embryonal carcinoma and mixed GCT exhibited high expression levels of some transcription factors, such as SLUG, SOX10 and NOTCH1, whereas SE had high expression levels of SNAIL and TCF3. These results suggested that the expression of EMT-associated genes may be associated with clinicopathological features, indicating that EMT markers may be relevant for classifying the histology of GCTs.

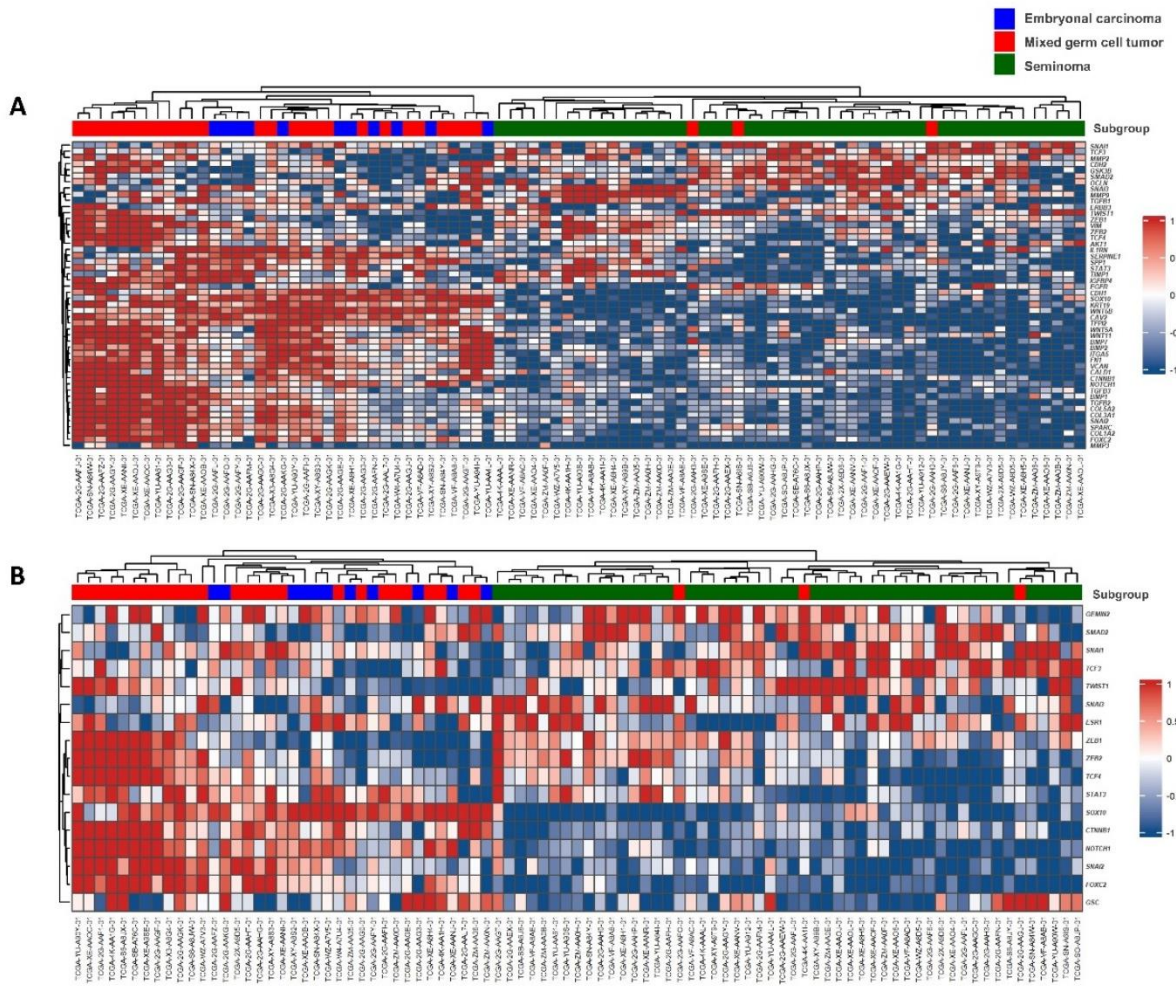


Figure 1. Heatmap and dendrogram of EMT-related genes. The expression levels were used to group the gene profiles according to their similarities, and the gene expression profiles of each histology were compared to each other. (A) Heatmap of the most significant genes associated with EMT. (B) Heatmap of EMT-related transcription factors. Rows indicate the relative expression levels for a single gene, and columns indicate the expression level for a single sample. Blue and red indicate the genes with lower and higher expression levels, respectively. EMT, epithelial-mesenchymal transition; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

According to the analyses, *SNAIL* and *SLUG* exhibited different expression levels in each histology. To clarify the expression of *SNAIL* and *SLUG* in TGCTs, the expression of these factors was evaluated individually in the three histological types (embryonal carcinoma, mixed GCT and SE). The results showed a significant difference in the expression of *SLUG* (Fig. 2A). *SLUG* was significantly upregulated in Mixed GCT compared with embryonal carcinoma and SE. No significant difference was observed in *SNAIL* expression (Fig. 2B).

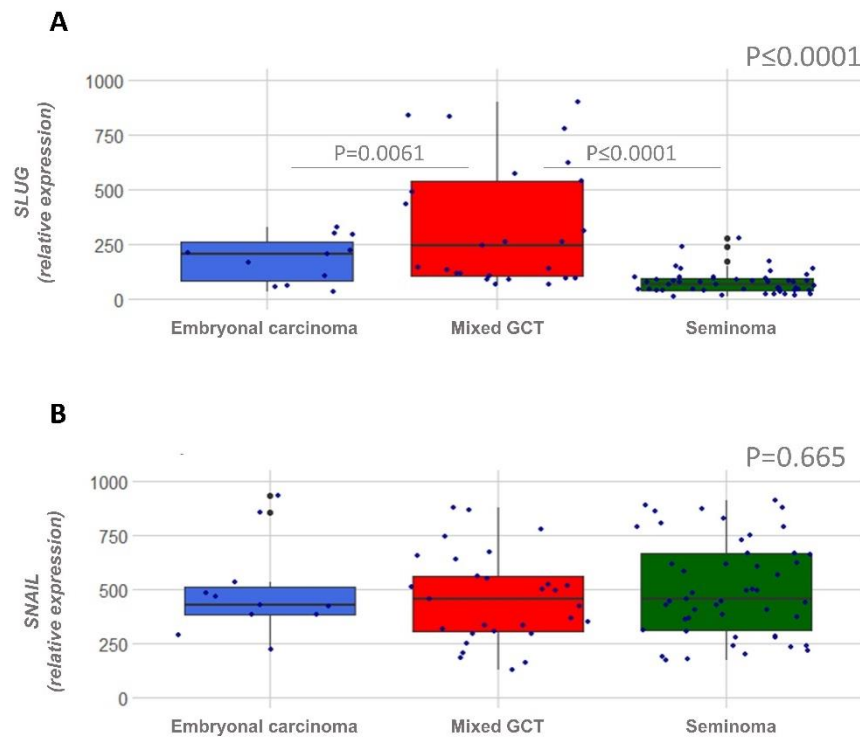


Figure 2. Boxplot of *SNAIL* and *SLUG* expression in testicular GCT. Expression of (A) *SLUG* and (B) *SNAIL* in embryonal carcinoma, mixed GCT and seminoma. GCT, germ cell tumor; *SLUG*, snail family transcriptional repressor 2; *SNAIL*, snail family transcriptional repressor 1.

The PFS of all patients was assessed, and patients with SE histology had a higher PFS compared with those with embryonal carcinoma (49.9 months vs. 27.6 months) and mixed GCT (49.9 months vs. 28.6 months) (Fig. 3A).

When analyzing individual the transcription factors *SNAIL* and *SLUG*, although not statistically significant, patients with lower and higher *SNAIL* expression had median PFS durations of 47.2 and 29.7 months, respectively (Fig. 3B). In addition, patients with lower *SLUG* expression had a median PFS of 46.4 months, compared to 28.0 months for those with higher *SLUG* expression (Fig. 3C). These findings highlight the significant effects of *SLUG* expression on PFS in patients with TGCT, suggesting that this EMT transcriptional regulator may be a potential prognostic marker and therapeutic target for GCTs (27).

Subsequently, an integrated analysis was performed to examine the differences in PFS of patients with both high and low levels of *SNAIL* and *SLUG*. The Snail superfamily of transcription factors encompasses *SNAIL*, *SLUG* and *SCRATCH* proteins, characterized by

their possession of a SNAG domain and a minimum of four functional zinc fingers. Through comparative analysis of these zinc-finger sequences, the superfamily has been delineated into SNAIL and SCRATCH families, with SLUG designated as a subfamily within the SNAIL group (28). Based on this evidence, integrated analyses were performed to verify the distinct impact of *SNAIL* and *SLUG*. Patients expressing low levels of both factors (*SNAIL*^{low}*SLUG*^{low}) had a higher PFS compared to those with high expression of both transcription factors (*SNAIL*^{high}*SLUG*^{high}); the respective median PFS durations were 54.3 and 16.5 months (Fig. 3D). In addition, patients in the *SNAIL*^{low}*SLUG*^{low} group had a higher PFS compared to those with high *SNAIL* expression and low *SLUG* expression (*SNAIL*^{high}*SLUG*^{low}), with median PFS durations of 54.3 and 34.1 months (Fig. 3D). Although the difference in PFS between *SNAIL*^{low}*SLUG*^{low} and *SNAIL*^{low}*SLUG*^{high} groups did not reach statistical significance, there was a trend favoring higher PFS in the *SNAIL*^{low}*SLUG*^{high} group (54.3 months vs. 31.1 months; Fig. 3D). In addition, the association between the expression levels of the transcription factors *SNAIL* and *SLUG*, both individually and combined, with PFS was analyzed in the distinct GCT histologies: Mixed tumor, SE and embryonal carcinoma.

The Bonferroni correction was performed after each log-rank test to account for multiple comparisons. However, for the SE (*SNAIL*^{low}*SLUG*^{low}) and embryonal carcinoma (*SNAIL*^{low}*SLUG*^{high}) groups, all samples were censored; therefore, it was not possible to calculate the averages for these groups. *SNAIL* and *SLUG* expression had no significant effect on PFS across the various histological types of GCTs, including SE, mixed GCT and embryonal carcinoma (Fig. S1). However, a trend emerged when all tumor types were analyzed collectively (Fig. 3), revealing an association between PFS and *SLUG* expression. This apparent discrepancy may be justified by the low number of samples within each histological subgroup, which could result in a loss of statistical power, thereby obscuring potential associations that become apparent only when the sample size is increased by combining all tumor types.

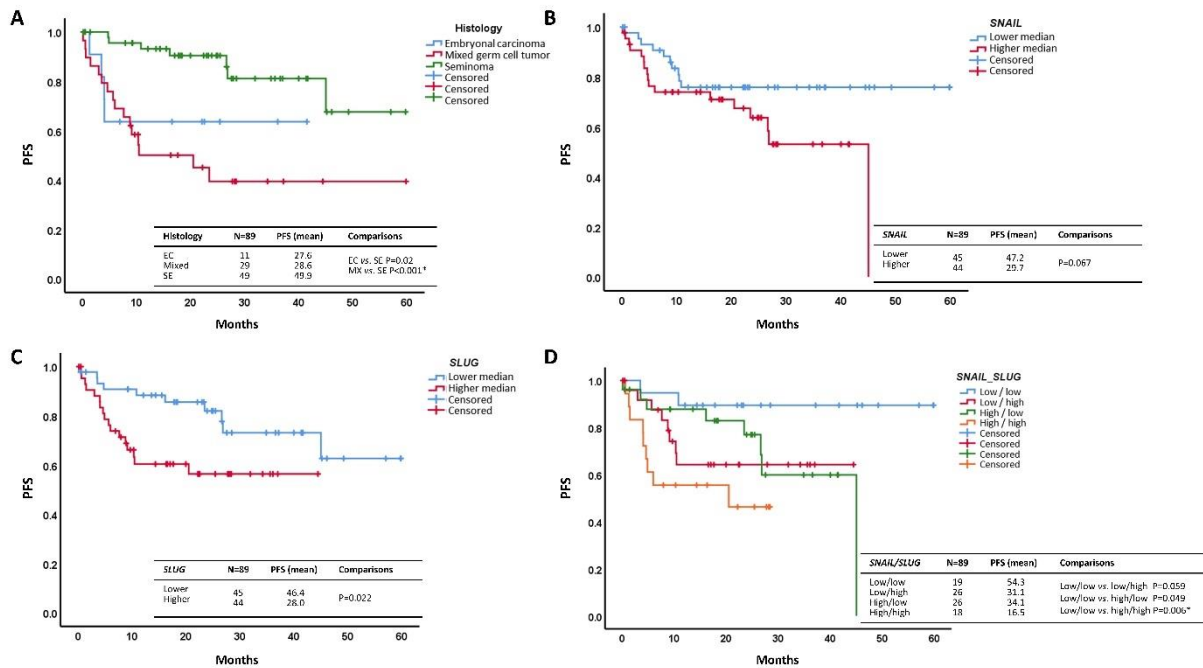


Figure 3. PFS of patients with testicular germ cell tumor. (A) Association of SE, MX and EC histological types with PFS. Association of the individual expression of (B) *SNAIL* and (C) *SLUG* transcription factors with PFS. (D) Association of the combination of *SNAIL* and *SLUG* expression with PFS. Bonferroni correction was applied after the log-rank test with $\alpha=0.05/3=0.0167$ for (A), and $\alpha=0.05/6=0.0083$ for (D). *Significant value for log-rank + Bonferroni. P-values equal to or less than the Bonferroni correction threshold were considered significant. EC, embryonal carcinoma; MX, mixed germ cell tumor; PFS, progression-free survival; SE, seminoma; *SLUG*, snail family transcriptional repressor 2; *SNAIL*, snail family transcriptional repressor 1.

Expression of EMT markers in GCT cell lines. Since EMT markers were associated with the histological classification of GCTs, and due to their effects on PFS, the mRNA expression levels of some EMT markers were examined in GCT cell lines (Fig. 4A). Compared with in JEG-3 cells, the NTERA-2 cell line exhibited increased expression levels of mesenchymal markers, such as *CDH2*, *VIM* and *SLUG*, and decreased *CDH1* and *SNAIL* expression. This difference in the expression of EMT-associated markers in both cell lines may be attributed to the distinct histological characteristics of the NTERA-2 (embryonal carcinoma) and JEG-3 (choriocarcinoma) lineages. Therefore, these data indicates a potential association between

EMT-associated genes and clinical parameters in GCTs, particularly with regard to the embryonal carcinoma histological subtype.

It has been reported that ~15% of patients with GCT are resistant to cisplatin-based chemotherapy (29,30), and the EMT process may serve a role in developing chemoresistance (31,32). Our previous study created an *in vitro* TGCT cisplatin-resistant model using the NTERA-2 cell line (23). Using this model, the present study investigated the expression levels of EMT-associated genes, and revealed that *FN1*, *VIM*, *ACTA2*, *COL1A1*, *TGF- β* and *SLUG* were significantly upregulated in NTERA-2R cells compared with those in the NTERA-2P cell line, and *CDH1* expression exhibited an increasing trend (Fig. 4B), after 72 h of cisplatin treatment. In addition, *CDH2* expression exhibited a decreasing trend in NTERA-2R cells, whereas there was no notable difference in *SNAIL* expression levels. Consistent with these findings, there was a trend toward higher levels of CDH1 protein, whereas the protein expression levels of CDH2 tended to decrease in NTERA-2R cells (Fig. S2). By contrast, there was no difference in VIM protein expression between the cell lines. Overall, these data suggested that EMT may be a critical factor in chemoresistance.

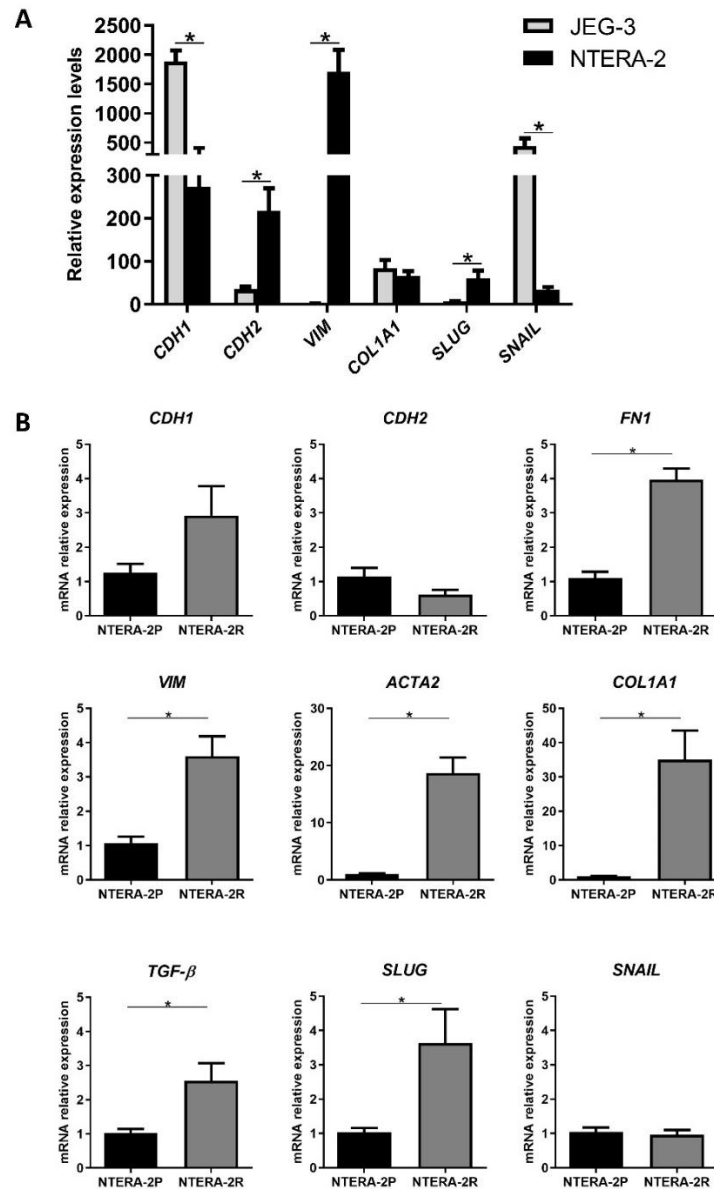


Figure 4. Expression of epithelial-mesenchymal transition-associated genes in germ cell tumor cell lines. (A) Relative expression levels of *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *COL1A1*, *SLUG* and *SNAIL* in NTERA-2 and JEG-3 cell lines. (B) Relative mRNA expression levels of *CDH1*, *CDH2*, *FN1*, *VIM*, *ACTA2*, *COL1A1*, *TGF- β* , *SLUG* and *SNAIL* in NTERA-2P and NTERA-2R cells after 72 h of cisplatin treatment. * $P \leq 0.05$. *ACTA2*, actin, $\alpha 2$, smooth muscle; *COL1A1*, collagen type I $\alpha 1$; *CDH*, cadherin; *FN1*, fibronectin; NTERA-2P, parental NTERA-2; NTERA-2R, cisplatin-resistant NTERA-2; *SLUG*, snail family transcriptional repressor 2; *SNAIL*, snail family transcriptional repressor 1; *TGF- β* , transforming growth factor- $\beta 1$; *VIM*, vimentin.

Expression of EMT-associated genes in a cisplatin-resistant mouse model of GCT. To validate whether EMT is a key factor in chemoresistance, NTERA-2P and NTERA-2R cells were implanted subcutaneously into nude mice (Fig. 5A). H&E staining and the expression levels of Ki-67, which is used as a proliferative marker (33,34), were comparable between the NTERA-2P and NTERA-2R groups. The tumors from both the NTERA-2P and NTERA-2R groups took 15-34 days to start growing after cell inoculation, when the nodule was visible enough to be measurable (Fig. 5B). Both NTERA-2P and NTERA-2R cells grew gradually in the animals. In the NTERA-2P group, the tumors took 30 to 53 days from the beginning until they reached $\sim 2,000 \text{ mm}^3$ in volume. In the NTERA-2R group the tumors took 25 to 37 days for this growth, which was similar to the NTERA-2P group.

Consistent with the findings observed *in vitro*, the NTERA-2R mouse model demonstrated a significant upregulation in the expression of *VIM* and *SLUG* (Fig. 5C), suggesting that *SLUG* may serve as the pivotal transcription factor bridging the association between EMT and cisplatin resistance.

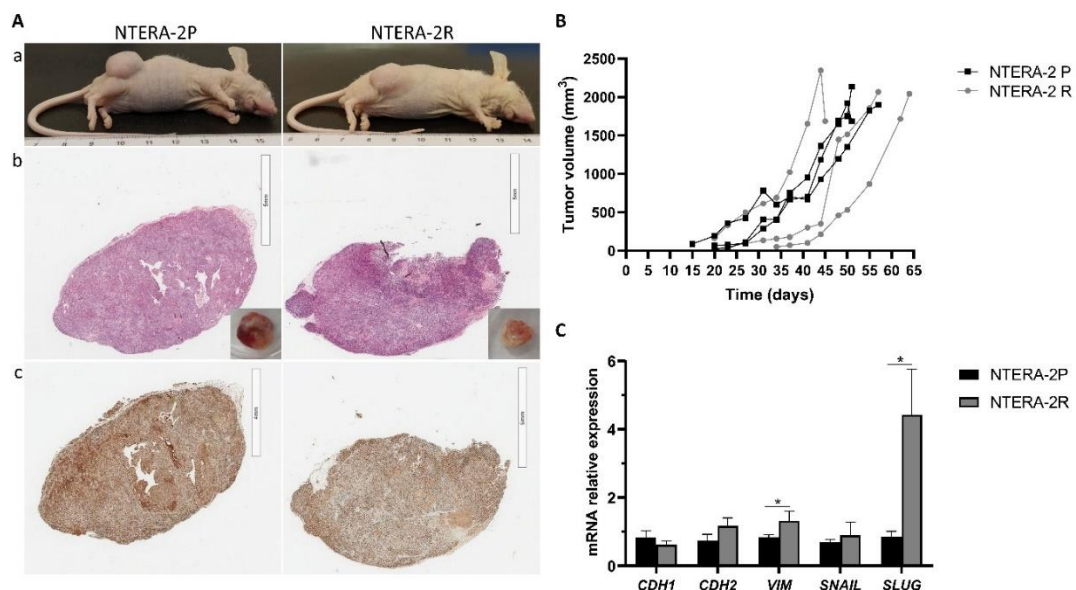


Figure 5. Animal models of germ cell tumors. (A) Representative images of a xenograft model of NTERA-2P and NTERA-2R. (Aa) Images of solid tumors. (Ab) Hematoxylin and eosin staining of NTERA-2P and NTERA-2R tumors (scale bars, 5 mm). (Ac) Expression of Ki-67 in NTERA-2P (scale bar, 4 mm) and NTERA-2R (scale bar, 5 mm) tumors. Slides were scanned using an Aperio CS2 scanner (Leica Microsystems, Inc.) at a magnification of x20. (B) Tumor growth curve of NTERA-2P (n=3) and NTERA-2R (n=3). (C) Relative mRNA expression levels of *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *SNAIL* and *SLUG* in NTERA-2P (n=3) and NTERA-2R tumors (n=3). * $P \leq 0.05$. *CDH*, cadherin; NTERA-2P, parental NTERA-2; NTERA-2R, cisplatin-

resistant NTERA-2; *SLUG*, snail family transcriptional repressor 2; *SNAIL*, snail family transcriptional repressor 1; *VIM*, vimentin.

Discussion

Between 10 and 20% of patients with TGCT have been reported to be resistant to cisplatin-based chemotherapy (30,35) and several molecular mechanisms have been shown to be related to chemoresistance, including the EMT process (36,37). The present study evaluated the role of the EMT-TF *SLUG* in TGCT. Overall, EMT markers were associated with histological subtype classification of TGCT, and the transcription factor *SLUG* was involved in PFS and chemoresistance. To the best of our knowledge, the present study was the first to evaluate cisplatin-resistant GCT models, focusing specifically on exploring the EMT regulator *SLUG*.

GCTs are heterogeneous tumors, and it is a challenge to study their genetic basis, especially molecular alternatives that may lead to histological classification of GCTs and improvement of chemoresistance. Studies have explored the molecular complexity and heterogeneity of GCTs by examining the gene expression patterns associated with EMT (38-40). The present study showed that SE, embryonal carcinoma and mixed GCT had different expression profiles for the main EMT markers. For example, SE is a highly curable tumor in most cases (41) due to its sensitivity to DNA damaging agents, and in the present study it exhibited downregulation of EMT markers, suggesting a low association with EMT, and consequently with the processes of chemoresistance and metastasis.

The interplay between EMT and cancer has been addressed in a number of reviews (5,42-45). EMT-related proteins have been analyzed in histological malignant ovarian GCT types; *VIM* and zinc finger E-box-binding homeobox 1 have been revealed to be significantly increased in immature teratomas compared with in yolk sac tumors and dysgerminomas (46). Growth factors and cytokines are the principal inducers of the EMT process, and they activate several signaling pathways that modulate EMT effectors, including the transcription factors *SNAIL* and *SLUG*. These regulatory factors suppress E-cadherin by binding proximal to the E-cadherin promoter at the E-box elements. Subsequently, epithelial cells gradually lose their epithelial characteristics and gain mesenchymal cell properties (1,2,38). *SLUG* is a transcriptional factor that has been evaluated in several types of human cancer (47-50), and has been reported to be associated with decreased E-cadherin expression, high histological grade, metastasis, postoperative recurrence and short-term survival (51,52). In addition, the high expression of *SLUG* has been shown to be significantly associated with shorter overall survival

of patients with cancer (53-55). In breast cancer survival rate analysis, 5-year survival was significantly lower for patients with positive SLUG expression, but only in patients harboring E-cadherin-preserved tumors, suggesting that SLUG may be critical to suppress the expression of E-cadherin (54). In lung adenocarcinoma, the upregulation of SLUG has been shown to be significantly related to postoperative relapse and shorter patient survival (53). Moreover, the overall survival analysis of patients with colorectal carcinoma and SLUG-positive expression was revealed to be poorer, and SLUG expression was identified as an independent prognostic factor (55). Furthermore, the immunohistochemical expression of SLUG and SNAIL has been investigated in patients with different stages of renal cell carcinoma; SLUG exhibited a higher incidence of expression in tumors with a sarcomatoid component. In addition, Kaplan-Meier survival curve analysis revealed no discernible disparity in survival rates relative to SLUG expression within the initial 3 years of follow-up. However, beyond this timeframe, patients whose tumors did not exhibit SLUG expression demonstrated significantly prolonged survival periods (56). Consistent with these observations, the present study was the first to demonstrate that the high expression of *SLUG* may have significant effects on the PFS of patients with TGCT, suggesting that regulation of *SLUG* could be a therapeutic alternative to improve PFS.

After conducting *in silico* analysis, EMT was evaluated in JEG-3 and NTERA-2 GCT cell lines by examining the expression of EMT markers. Compared with in JEG-3 cells, NTERA-2 cells showed increased expression of mesenchymal markers (*CDH2*, *VIM* and *SLUG*) and decreased expression of an epithelial marker (*CDH1*). This difference may be explained by the distinct origins of the cell lines: NTERA-2 cells come from embryonal carcinoma, whereas JEG-3 cells originate from choriocarcinoma, and they are different in their cellular differentiation and biological behavior. Embryonal carcinoma cells are pluripotent and resemble early embryonic stem cells, which have the potential to differentiate into several cell types (11). By contrast, choriocarcinoma is a more differentiated form of GCT that resembles placental tissue, specifically trophoblast cells (8). Therefore, embryonal carcinoma cells, due to their less differentiated state and higher plasticity, are more prone to undergo EMT than the more differentiated choriocarcinoma cells.

While TGCT has a high survival rate, some patients develop a tumor relapse after the first treatment or have refractory disease (30). Resistance to chemotherapy may be multifactorial, and EMT is one of the biological processes linked to resistance. The present study elucidated the association between EMT and cisplatin resistance using a cisplatin-resistant model, which showed upregulation of *FN1*, *VIM*, *ACTA2*, *COL1A1*, *TGF- β* and *SLUG* genes. In our previous study, a phenotypic characterization of a cisplatin-resistant model was performed and was

shown to exhibit a more aggressive phenotype compared with parental cells (23). This was evidenced by a significant increase in cell proliferation, greater clonogenic survival and higher migration rates. The increase in all of these processes may be closely associated with EMT.

Using a cell line model of cisplatin-resistant ovarian cancer, Haslehurst *et al* (57) showed upregulation of VIM, SNAIL and SLUG, and downregulation of E-cadherin in chemoresistant cells. In addition, the knockdown of *SNAIL* and *SLUG* reversed the EMT phenotype and reduced cellular resistance to cisplatin (57). The crosstalk between STAT3 and p53/RAS signaling controls metastasis and cisplatin resistance in ovarian cancer cells through the SLUG/MAPK/PI3K/AKT-mediated regulation of EMT (58). Taken together, these reports suggest that EMT-related markers may serve a critical role in cisplatin resistance in GCT, thus leading to the establishment of biomarkers of drug response and new potential therapeutic approaches to overcome resistance to chemotherapy. Although EMT significantly impacts drug resistance in several types of cancer, the molecular mechanisms involved are poorly understood.

The present study also revealed that a NTERA-2R mouse model exhibited a significant upregulation in *SLUG* expression. Despite several studies addressing the impact of *SLUG* on drug resistance (59-61), none have analyzed this in the context of GCT. *SLUG* can increase the chemoresistance of various types of cancer, such as malignant mesothelioma and cholangiocarcinoma. In addition, *SLUG* overexpression has been shown to assist in apoptosis resistance in leukemic progenitors and may be related to imatinib resistance of chronic myelocytic leukemia (62). *SLUG*-knockdown may also enhance the sensitivity of neuroblastoma cells to imatinib by downregulating Bcl-2 expression (63). These findings suggest a crucial role of *SLUG* in drug resistance; therefore, targeting EMT-TFs may be proposed as a novel strategy to treat drug resistance (64).

In conclusion, the present study provided information on the relationship between cisplatin resistance and the EMT process in TGCT. The present investigation into the EMT regulator *SLUG* in TGCT is pioneering, revealing its association with histological subtypes, PFS and chemoresistance. The findings revealed the significance of EMT in the context of cisplatin resistance, highlighting *SLUG* as a potential therapeutic target to improve patient outcomes. These insights suggest that targeting EMT-TFs, such as *SLUG*, may be a promising strategy to overcome drug resistance and enhance therapeutic efficacy in TGCT. However, further elucidation of the molecular mechanisms underlying EMT and drug resistance holds promise for developing novel therapeutic interventions for TGCT.

Acknowledgements

Not applicable.

Funding

The present study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil (grant nos. 2019/07502-8; 2020/13286-3; 2018/13026-1; 2018/18808-8; 2018/15065-4), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (grant no. 121336/2019-0), the Public Ministry of Labor Campinas (Research, Prevention, and Education of Occupational Cancer—15^a zone, Campinas, Brazil) and Researcher Support Program from Barretos Cancer Hospital.

Availability of data and materials

The data generated in the present study may be requested from the corresponding author.

Authors' contributions

MTP conceptualized the study. The experiments were performed by IIVC, MNR, LMBT, LPR, LABP, LS, JMSG, ICT, AVHL, and SAT. MTP, MNR, MCDC, RMR, LFL and DAM performed data analysis. LFL was responsible for clinical data of patients. IIVC, MNR, RMR, LFL and MTP wrote the original draft. IIVC, MNR, AVHL, DAM, LS, SAT, RMR, LFL, and MTP reviewed and edited the manuscript. RMR, LFL, and MTP supervised the project. MTP administered the project. MTP and RMR acquired funding. MTP and IIVC confirm the authenticity of all the raw data. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the IACUC at Barretos Cancer Hospital (approval no. 010/2020).

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Kalluri R and Weinberg R a: Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation* 119: 1420–1428, 2009.
2. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ and Nieto MA: Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139: 871–890, 2009.
3. Yang J and Weinberg RA: Epithelial-Mesenchymal Transition: At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Dev Cell* 14: 818–829, 2008.
4. Ye X and Weinberg RA: Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol* 25: 675–686, 2015.
5. Kaufhold S and Bonavida B: Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 33: 62, 2014.
6. Grasset EM, Dunworth M, Sharma G, *et al.*: Triple-negative breast cancer metastasis involves complex epithelial-mesenchymal transition dynamics and requires vimentin. *Sci Transl Med* 14, 2022.
7. TSOUKALAS N, ARAVANTINOUE-FATOROU E, TOLIA M, *et al.*: Epithelial–Mesenchymal Transition in Non Small-cell Lung Cancer. *Anticancer Res* 37: 1773–1778, 2017.
8. Palamaris K, Felekouras E and Sakellariou S: Epithelial to Mesenchymal Transition: Key Regulator of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression and Chemoresistance. *Cancers (Basel)* 13: 5532, 2021.
9. Sessa C, Schneider DT, Planchamp F, *et al.*: ESGO–SIOPE guidelines for the management of adolescents and young adults with non-epithelial ovarian cancers. *Lancet Oncol* 21: e360–e368, 2020.
10. Ghazarian AA, Kelly SP, Altekruze SF, Rosenberg PS and McGlynn KA: Future of testicular germ cell tumor incidence in the United States: Forecast through 2026. *Cancer* 123: 2320–2328, 2017.
11. Pierce JL, Frazier AL and Amatruda JF: Pediatric Germ Cell Tumors: A Developmental Perspective. *Adv Urol* 2018: 1–8, 2018.
12. Culine S, Kramar A, Théodore C, *et al.*: Randomized Trial Comparing Bleomycin/Etoposide/Cisplatin With Alternating Cisplatin/Cyclophosphamide/Doxorubicin and Vinblastine/Bleomycin Regimens of Chemotherapy for Patients With Intermediate- and Poor-Risk Metastatic Nonseminomatous Germ Cell Tumors: Genito-Urinary Group of the French Federation of Cancer Centers Trial T93MP. *Journal of Clinical Oncology* 26: 421–427, 2008.

13. Pinto MT, Cárcano FM, Vieira AGS, Cabral ERM and Lopes LF: Molecular Biology of Pediatric and Adult Male Germ Cell Tumors. *Cancers (Basel)* 13: 2349, 2021.
14. de Vries G, Rosas-Plaza X, van Vugt MATM, Gietema JA and de Jong S: Testicular cancer: Determinants of cisplatin sensitivity and novel therapeutic opportunities. *Cancer Treat Rev* 88: 102054, 2020.
15. Vega S, Morales A V., Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I and Nieto MA: Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev* 18: 1131–1143, 2004.
16. Saxena M, Stephens MA, Pathak H and Rangarajan A: Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis* 2: e179–e179, 2011.
17. Wu K and Bonavida B: The Activated NF- κ B-Snail-RKIP Circuitry in Cancer Regulates Both the Metastatic Cascade and Resistance to Apoptosis by Cytotoxic Drugs. *Crit Rev Immunol* 29: 241–254, 2009.
18. Lee HH, Lee SH, Song KY, *et al.*: Evaluation of Slug expression is useful for predicting lymph node metastasis and survival in patients with gastric cancer. *BMC Cancer* 17: 670, 2017.
19. Gu A, Jie Y, Yao Q, Zhang Y and Mingyan E: Slug Is Associated With Tumor Metastasis and Angiogenesis in Ovarian Cancer. *Reproductive Sciences* 24: 291–299, 2017.
20. Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, *et al.*: SLUG/SNAI2 and Tumor Necrosis Factor Generate Breast Cells With CD44+/CD24- Phenotype. *BMC Cancer* 10: 411, 2010.
21. Shen H, Shih J, Hollern DP, *et al.*: Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors. *Cell Rep* 23: 3392–3406, 2018.
22. Gu Z, Eils R and Schlesner M: Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32: 2847–2849, 2016.
23. Lengert A van H, Pereira L do NB, Cabral ERM, *et al.*: Potential New Therapeutic Approaches for Cisplatin-Resistant Testicular Germ Cell Tumors. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 27: 245, 2022.
24. Silva-Oliveira RJ, Silva VAO, Martinho O, *et al.*: Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker. *Cellular Oncology* 39: 253–263, 2016.
25. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 45e–445, 2001.
26. Teixeira SA, Luzzi M de C, Martin ACBM, *et al.*: The Barretos Cancer Hospital Animal Facility: Implementation and Results of a Dedicated Platform for Preclinical Oncology Models. *Vet Sci* 9: 636, 2022.

27. Mikami S, Katsube K-I, Oya M, *et al.*: Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. *Laboratory Investigation* 91: 1443–1458, 2011.
28. Kaufhold S and Bonavida B: Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 33: 62, 2014.
29. Gerwing M, Jacobsen C, Dyshlovoy S, *et al.*: Cabazitaxel overcomes cisplatin resistance in germ cell tumour cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 142: 1979–1994, 2016.
30. de Vries G, Rosas-Plaza X, van Vugt MATM, Gietema JA and de Jong S: Testicular cancer: Determinants of cisplatin sensitivity and novel therapeutic opportunities. *Cancer Treat Rev* 88: 102054, 2020.
31. Wang J, Wei Q, Wang X, *et al.*: Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance. *Genes Dis* 3: 3–6, 2016.
32. Smith B and Bhowmick N: Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J Clin Med* 5: 17, 2016.
33. Tang LH, Gonen M, Hedvat C, Modlin IM and Klimstra DS: Objective Quantification of the Ki67 Proliferative Index in Neuroendocrine Tumors of the Gastroenteropancreatic System. *American Journal of Surgical Pathology* 36: 1761–1770, 2012.
34. Klimowicz AC, Bose P, Petrillo SK, Magliocco AM, Dort JC and Brockton NT: The prognostic impact of a combined carbonic anhydrase IX and Ki67 signature in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 109: 1859–1866, 2013.
35. Fukawa T and Kanayama H: Current knowledge of risk factors for testicular germ cell tumors. *International Journal of Urology* 25: 337–344, 2018.
36. Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB and Menck CFM: DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics* 73: e478s, 2018.
37. Brasseur K, Gévry N and Asselin E: Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. *Oncotarget* 8: 4008–4042, 2017.
38. Antony J, Thiery JP and Huang RY-J: Epithelial-to-mesenchymal transition: lessons from development, insights into cancer and the potential of EMT-subtype based therapeutic intervention. *Phys Biol* 16: 041004, 2019.
39. Wakileh GA, Bierholz P, Kotthoff M, *et al.*: Molecular characterization of the CXCR4 / CXCR7 axis in germ cell tumors and its targetability using nanobody-drug-conjugates. *Exp Hematol Oncol* 12: 96, 2023.
40. Bremmer F, Schallenberg S, Jarry H, *et al.*: Role of N-cadherin in proliferation, migration, and

invasion of germ cell tumours. *Oncotarget* 6: 33426–33437, 2015.

41. Classen J, Souchon R, Hehr T and Bamberg M: Treatment of early stage testicular seminoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 475–481, 2001.
42. De Las Rivas J, Brozovic A, Izraely S, Casas-Pais A, Witz IP and Figueroa A: Cancer drug resistance induced by EMT: novel therapeutic strategies. *Arch Toxicol* 95: 2279–2297, 2021.
43. Lu W and Kang Y: Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Dev Cell* 49: 361–374, 2019.
44. Singh A and Settleman J: EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29: 4741–4751, 2010.
45. Singh D and Siddique HR: Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer progression: unraveling the immunosuppressive module driving therapy resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* 43: 155–173, 2024.
46. Solheim O, Førsund M, Tropé CG, Kraggerud SM, Nesland JM and Davidson B: Epithelial-mesenchymal transition markers in malignant ovarian germ cell tumors. *APMIS* 125: 781–786, 2017.
47. Schinke H, Pan M, Akyol M, *et al.*: SLUG-related partial epithelial-to-mesenchymal transition is a transcriptomic prognosticator of head and neck cancer survival. *Mol Oncol* 16: 347–367, 2022.
48. Kim H, Lee SB, Myung JK, *et al.*: SLUG is a key regulator of epithelial-mesenchymal transition in pleomorphic adenoma. *Laboratory Investigation* 102: 631–640, 2022.
49. Noguchi S, Hirano K, Tanimoto N, Shimada T and Akiyoshi H: SLUG is upregulated and induces epithelial mesenchymal transition in canine oral squamous cell carcinoma. *Vet Comp Oncol* 20: 134–141, 2022.
50. Önder E, Çil N, Seçme M and Mete GA: Effect of alpha lipoic acid on epithelial mesenchymal transition in SKOV-3 cells. *Gene* 892: 147880, 2024.
51. Alves CC: Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Frontiers in Bioscience Volume*: 3035, 2009.
52. Shih J-Y and Yang P-C: The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis* 32: 1299–1304, 2011.
53. Shih J-Y, Tsai M-F, Chang T-H, *et al.*: Transcription Repressor *Slug* Promotes Carcinoma Invasion and Predicts Outcome of Patients with Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 11: 8070–8078, 2005.
54. Martin TA, Goyal A, Watkins G and Jiang WG: Expression of the Transcription Factors Snail, Slug, and Twist and Their Clinical Significance in Human Breast Cancer. *Ann Surg Oncol* 12:

488–496, 2005.

55. Alves CC: Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Frontiers in Bioscience* Volume: 3035, 2009.
56. Zivotic M, Kovacevic S, Nikolic G, *et al.*: SLUG and SNAIL as Potential Immunohistochemical Biomarkers for Renal Cancer Staging and Survival. *Int J Mol Sci* 24: 12245, 2023.
57. Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, *et al.*: EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer* 12: 91, 2012.
58. Liang F, Ren C, Wang J, *et al.*: The crosstalk between STAT3 and p53/RAS signaling controls cancer cell metastasis and cisplatin resistance via the Slug/MAPK/PI3K/AKT-mediated regulation of EMT and autophagy. *Oncogenesis* 8: 59, 2019.
59. Oh S-J, Ahn E-J, Kim O, *et al.*: The Role Played by SLUG, an Epithelial–Mesenchymal Transition Factor, in Invasion and Therapeutic Resistance of Malignant Glioma. *Cell Mol Neurobiol* 39: 769–782, 2019.
60. Shen C-J, Kuo Y-L, Chen C-C, Chen M-J and Cheng Y-M: MMP1 expression is activated by Slug and enhances multi-drug resistance (MDR) in breast cancer. *PLoS One* 12: e0174487, 2017.
61. Chang L, Hu Y, Fu Y, *et al.*: Targeting slug-mediated non-canonical activation of c-Met to overcome chemo-resistance in metastatic ovarian cancer cells. *Acta Pharm Sin B* 9: 484–495, 2019.
62. Mancini M, Petta S, Iacobucci I, Salvestrini V, Barbieri E and Santucci MA: Zinc-finger transcription factor slug contributes to the survival advantage of chronic myeloid leukemia cells. *Cell Signal* 22: 1247–1253, 2010.
63. Vitali R, Mancini C, Cesi V, *et al.*: Slug (SNAI2) Down-Regulation by RNA Interference Facilitates Apoptosis and Inhibits Invasive Growth in Neuroblastoma Preclinical Models. *Clinical Cancer Research* 14: 4622–4630, 2008.
64. Saxena M, Stephens MA, Pathak H and Rangarajan A: Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis* 2: e179–e179, 2011.

Supplementary figures

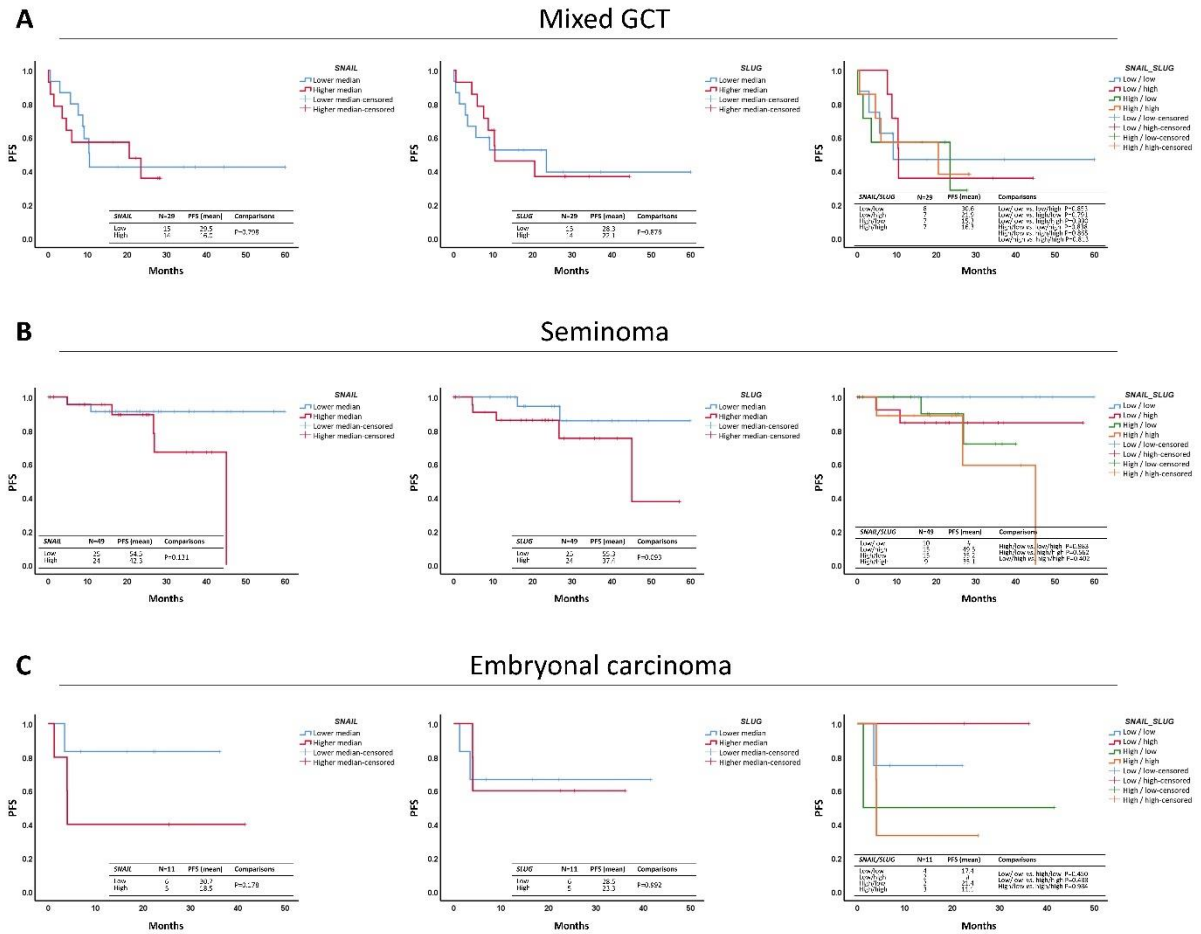


Figure S1. PFS of patients with testicular GCT. Association of the individual expression of *SNAIL* and *SLUG* transcription factors, and the combination of both factors, with PFS in patients with (A) mixed GCT, (B) seminoma and (C) embryonal carcinoma histological types. Bonferroni correction was applied after the log-rank test with $\alpha=0.05/6=0.0083$. #It was not possible to calculate the average because all events were censored. GCT, germ cell tumor; *SLUG*, snail family transcriptional repressor 2; *SNAIL*, snail family transcriptional repressor 1.

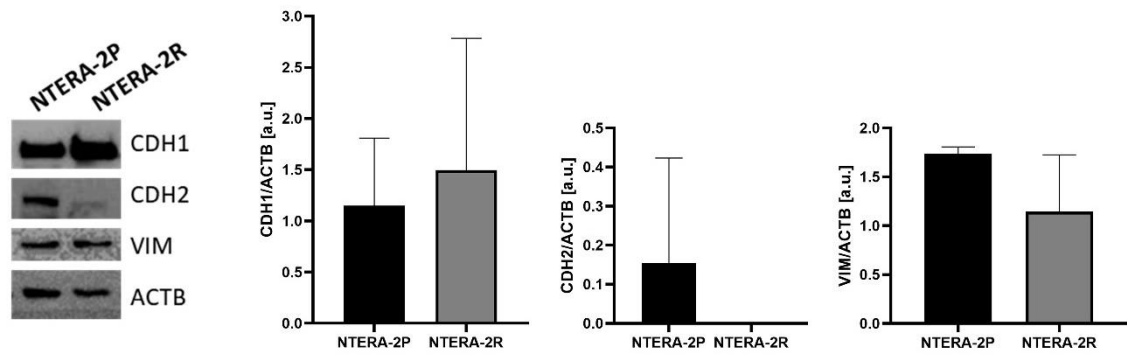


Figure S2. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers in germ cell tumor cell lines. Western blot analysis of the basal level of CDH1, CDH2, VIM and ACTB in NTERA-2P and NTERA-2R cells after 72 h of cisplatin treatment. Semi-quantification of blots was normalized to ACTB levels. ACTB, β -actin; a.u., arbitrary units; CDH, cadherin; NTERA-2P, parental NTERA-2; NTERA-2R, cisplatin-resistant NTERA-2.

Anexo B. Identificação das amostras (ID) dos TCG misto e as porcentagens de cada histologia.

ID-TCGT	% HISTOLOGIA
TCGA_2G_AAFI	CE 85% YST 5% ChC 5% e SE 5%
TCGA_2G_AAFJ	TM 90%, CE 10% e YST <1%
TCGA_2G_AAFZ	TM 90%, CE 30% e YST 30%
TCGA_2G_AAGO	CE 80% TM 10% e YST 10%
TCGA_2G_AAG3	SE 50% , TM 35%, CE 10% e YST 5%
TCGA_2G_AAGC	TM 70%, CE 15%, SE 10%, ChC >4% e YST 1%
TCGA_2G_AAGF	TM+TI 50%, CE 40% e YST 5%
TCGA_2G_AAGJ	CE 85% e SE 15%
TCGA_2G_AAGK	YST 75%, CE 20% e SE 5%
TCGA_2G_AAGT	TM 80% e YST 20%
TCGA_2G_AAGY	TM 90%, TI 5%, e CE 5%
TCGA_2G_AAHO	SE 95% e CE 5%
TCGA_2G_AA3H	TM+ TI 60%, SE 35%, YST 5%
TCGA_2G_AAL7	SE 95% e YST 5%
TCGA_SN_A6IS	SE 85% e TM 15%
TCGA_SN_A84W	80% SE, TM 10%, CE 5% e YST 5%
TCGA_SN_A84X	CE 15%, YST 5%, TM 30%, TI 30% e SE 20%
TCGA_SN_A84Y	YST 50%, 50% CE e <2% TI
TCGA_VF_A8A8	CE 95%, TM 5% e <1%
TCGA_X3_A8AD	CE 95% e YST 5%
TCGA_XE_A8G4	SE 40%, YST 35%, TM 5%
TCGA_XE_AANI	TI 85%, CE <5% e YST <10%
TCGA_XE_AAOB	TM e TI 60%, CE 30%, YST 5% e ChC 5%
TCGA_XE_AAOC	TM e TI 99% com focos de YST
TCGA_XY_A8OJ	YST 50%, TM e TI 40% e SE 19%
TCGA_YU_A8S3	CE 80%, YST 15% e 5%ChC
TCGA_YU_A90Y	CE 80%, YST 15% e 5%ChC
TCGA_TU_A941	YST 95% e ChC 5%
TCGA_YU_AA61	TM e TI 50%, YST 25% e CE 25%