

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**Importância dos fatores de Yamanaka e
NANOG na resposta ao tratamento com
cisplatina ou etoposídeo em células de
teratocarcinoma P19**

Emilly Schlee Villodre

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular do Centro de
Biotecnologia da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.**

**Orientador: Dr. Guido Lenz
Porto Alegre, dezembro de 2016**

Esse trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do departamento de Biofísica na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratorio de Regulación Génica en Células Madre na Universidade de Buenos Aires, na Unidade de Análise Molecular e Proteínas e Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Além de ser financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE nº 150109) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e pelo Programa Binacional de Terapia Celular (CAPES – PROBITEC nº 907/2012).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma me ajudaram na realização desse projeto.

Primeiramente agradeço ao meu orientador Guido Lenz. Muito obrigada por esses mais de 10 anos de aprendizado, parceria e paciência. Obrigada por todos os ensinamentos tanto científicos, burocráticos quanto pessoais. É uma honra ter sido a tua aluna e ter tido o prazer de conviver por todos esses anos e acompanhar o teu reconhecimento científico como um importante pesquisador brasileiro.

Agradeço a minha comissão de acompanhamento, os professores Charley Christian Staats e Diego Bonatto, pelas críticas e sugestões que enriqueceram esse trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas do Laboratório de Sinalização. Todos foram importantes nessa minha trajetória no lab, desde os primeiros anos aprendendo como IC e também ganhando amigos: a Pítia, Ale T., Lauren, Ale P. Lavínia. Depois durante o mestrado mais amigos importantes surgiram José, Eduardo, Andrew e Fran. Fran, Mi, Mardja, Darlan, Marcos: obrigada por toda a ajuda, todas as conversas e risadas, vocês são uma das principais razões de ter me dado a alegria de ir pro Vale todos os dias :) . Alex, Gio, Mari, Karen, Patrícia obrigada por tudo! May, tu foste bastante importante nesse processo, sempre me ajudando quando eu precisei. Kaká, minha parceira de clínicas e, mesmo ninguém acreditando, formamos uma bela dupla. PatiLu, desde o meu mestrado tu foste uma das principais pessoas a me ajudar, me colocar no foco, seja no lado científico quanto pessoal; ver o teu crescimento como pesquisadora é uma honra. Agradeço também aos amigos que fiz durante meu doutorado-sanduíche no Laboratorio de Regulación Génica en Células Madre: Claudia, Ariel, Soledad, Jesica, Camila, Victoria, Mark e a minha orientadora Alejandra. Gracias por todo el aprendizaje y la amistad. E também agradeço a todos da UAMP, UEA e Unidade de Patologia do HCPA.

Agradeço à banca pela disponibilidade e colaboração.

Agradeço à Silvia Regina Centeno e Luciano Saucedo pela ajuda para tirar

as dúvidas sempre que necessitei.

Agradeço ao CAPES, FIPE e PROBITEC pelo apoio financeiro.

Aos meus familiares gaúchos e catarinas obrigada por estarem sempre ao meu lado. E aos meus amigos, um MUITO OBRIGADA pelo carinho.

Obrigada Ivan por todo o amor, todo o companheirismo diário que tu me passa. É muito bom te ter ao meu lado e ter redescoberto o significado da palavra felicidade.

E o meu maior agradecimento vai para as pessoas mais importantes da minha vida: os meus pais, Jorge e Rosy, o meu irmão, Victor, Lindsey e o meu gordo Adrian. Vocês são a razão de eu ser quem eu sou e por estar aqui hoje, nada disso seria possível se não fosse por vocês estarem comigo. Obrigada por tudo, amo vocês!!

“Eu tenho uma filosofia pessoal na vida: se alguém pode fazer o que estou fazendo, eles deveriam fazê-lo. E o que eu quero fazer é descobrir coisas que representem uma contribuição única para o mundo – a contribuição que apenas eu e meu portfólio de talentos podemos fazer acontecer. Essas são minhas prioridades na vida”

Neil deGrasse Tyson

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
1. TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS (TCG)	12
1.1. Teratomas	13
1.2. A linhagem de carcinoma embrionário murino P19	14
1.3. Tratamento	15
1.3.1. Cisplatina	15
1.3.2. Etoposídeo	18
2. FATORES DE TRANSCRIÇÃO	19
2.1. OCT4	21
2.2. KLF4	22
2.3. SOX2	26
2.4. NANOG	29
2.5. c-MYC	32
2.6. Rede integrada dos fatores de transcrição	35
2.6.1. Células Pluripotente Induzidas	36
HIPÓTESE	39
OBJETIVO	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
CAPÍTULOS	41
CAPÍTULO I	42
CAPÍTULO II	51
CAPÍTULO III	71
DISCUSSÃO	97
PERSPECTIVAS	105
CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
CURRICULUM VITAE	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo proposto para a tumorigênese de células germinativas testicular	12
Figura 2. Vias de atuação da cisplatina nos mecanismos de resistência e sensibilidade em tumores de células germinativas	17
Figura 3. Modelo da atuação de KLF4 na tumorigênese	24
Figura 4. Vias de regulação de NANOG	30
Figura 5. Via para formação das células pluripotentes induzidas (iPSC)	37

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Características dos fatores de transcrição em humanos.....	20
Tabela II. Características dos fatores de transcrição em camundongos.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluoracila
ATP	Trifosfato de adenosina (<i>adenosine triphosphate</i>)
BEP	Bleomicina, Etoposídeo e Cisplatina
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
c-MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
c-MYC KD	Células silenciadas para c-MYC
CDDP	Cisplatina
Cdks	Cinases dependente de ciclinas
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CSCs	Células tronco tumorais (<i>cancer stem cells</i>)
Ctl KD	Células controle de silenciamento
EC	Carcinoma embrionário (<i>embryonal carcinoma</i>)
ECCs	Células de carcinoma embrionário (<i>embryonal carcinoma cells</i>)
ESCs	Células tronco embrionárias (<i>embryonic stem cells</i>)
F9	Linhagem celular: teratocarcinoma murino
GSCs	Células tronco de gliomas (<i>glioma stem cells</i>)
H&E	Hematoxilina & Eosina
HMG	Motivo do grupo de alta mobilidade (<i>High mobility group</i>)
ICM	Camada de células interna (<i>inner cell mass</i>)
IFN- γ	Interferon gama
IHC	Imunohistoquímica
iPSC	Células pluripotente induzidas (<i>induced pluripotent cells</i>)
kDa	Unidade de medida: quilo Dalton
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
KLF4 KD	Células silenciadas para KLF4
LIF	Fator inibidor de leucemia (<i>leukemia inhibitor factor</i>)
M	unidade de medida: molar
MCF-7	Linhagem celular: câncer de mama

MDR1	Gene de resistência à múltiplas drogas (<i>multiple drug resistance gene</i>)
mg/kg	unidade de medida: miligrama por kilograma
miRNA ou miR	microRNA
MMR	sistema de reparo de pareamento errado (<i>mismatch repair</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MSCs	Células tronco mesenquimais (<i>mesenchymal stem cells</i>)
NANOG KD	Células silenciadas para NANOG
NANOGP8	NANOG pseudogene 8
NER	Reparo de excisão de nucleotídeos (<i>nucleotide excision repair</i>)
NSTCG	Tumores de células germinativas testicular não-seminoma (<i>non-seminomatous germ cell tumors</i>)
OCT4	Octamer 4
OCT4 KD	Células silenciadas para OCT4
P19	Linhagem celular: teratocarcinoma murino
PG	pseudogene
POUF	domínio POU
RA	Ácido retinóico
shRNA	short harpin RNA
SOX2	<i>SRY-related high mobility group box 2</i>
SOX2 KD	Células silenciadas para SOX2
TCG	Tumores de células germinativas
TCGT	Tumores de células germinativas testicular
TE	Trofoectoderme
TFs	Fator de transcrição
Topo II	Topoisomerase II
VP-16	Etoposídeo
WT	Células selvagem (<i>wild type</i>)
YF	Fatores de Yamanaka (<i>Yamanaka Factors</i> - OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC)
µM	unidade de medida: micro molar

RESUMO

As células pluripotentes induzidas (iPSC) apresentam um grande potencial terapêutico, mas seu uso é dependente da capacidade de encontrar estratégias para suprimir o seu potencial tumorigênico. No entanto, esse risco diminui com a utilização de células num estado mais diferenciado. O uso dos fatores de transcrição OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC e NANOG para induzir iPSC demonstraram a já conhecida importância desses genes para manter o estado pluripotente. Portanto, a hipótese do presente trabalho é que a presença desses genes seriam os responsáveis pelos teratomas formados a partir das iPSC. P19 é uma linhagem de teratocarcinoma amplamente utilizada como modelo de iPSC, uma vez que apresenta células de carcinoma embrionário (semelhantes as células tronco embrionárias, mas malignas), além de ter a capacidade de se diferenciar em células derivadas dos três folhetos embrionários. Teratocarcinomas são um dos tumores testiculares de células germinativas (TCGT) mais comuns e também um dos tumores sólidos mais curáveis. Entretanto, uma pequena parcela dos pacientes apresentam resistência ao tratamento com cisplatina ou etoposídeo. Nosso objetivo foi avaliar a importância dos fatores comumente utilizados nas iPSC tanto na indução de teratomas quanto na sua contribuição na resistência de TCGT. Desse modo, silenciámos (KD), separadamente, os fatores nas células P19 e, após a confirmação do silenciamento, caracterizamos as células quanto a sua capacidade de formar teratoma. Nossos resultados mostraram que todas as células KD foram capazes de formar tumores, mas apenas a redução de OCT4 e SOX2 geraram tumores mais diferenciados, apresentando células derivadas de todas as camadas germinativas. Os resultados *in vitro* demonstraram que apenas KLF4 e c-MYC KD aumentaram a sensibilidade à cisplatina sozinha ou combinada com etoposídeo. Células OCT4 KD apresentaram resistência semelhante as células controle, e SOX2 KD respondeu somente à combinação, enquanto que NANOG apenas à cisplatina. Assim, nossos resultados sugerem que análise KLF4 e c-MYC pode ser útil para detectar uma possível resistência ao tratamento em TCGT.

ABSTRACT

Induced pluripotent cells (iPSC) have a great potential for therapeutic use, which is dependent on the ability to abolish their tumorigenic potential. However, this risk decreases with the use of cells in a more differentiated state. The use of OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC and NANOG to induce iPSC demonstrated the already known importance of these genes to maintain stemness. Therefore, our working hypothesis is that the presence of these genes is responsible for iPSC-derived teratomas. P19 teratocarcinoma cell line is widely used as an iPSC model, since it presents embryonic carcinoma cells (similar to embryonic stem cells, but are malignant), besides having the capacity to differentiate into cells derived from the three embryonic germ layers. Teratocarcinomas are one of the most common type of testicular germ cell tumors (TGCT), and also the most curable solid tumors. However, a small proportion of patients present resistance to cisplatin or etoposide. Our aim was to evaluate the importance of the transcription factor commonly used to induce iPSC in the induction of teratoma and also their contribution in the resistance induction. Therefore, we separately knocked down (KD) the transcription factors in P19 cells and after the silencing confirmation we characterized them for their capacity to form a mature teratoma. Our results showed that all KD cells were able to form tumors, but only reduction of OCT4 and SOX2 generated a more differentiated tumor, presenting cells from all embryonic germ layers. *In vitro* results showed that only the absence of KLF4 and c-MYC increased sensitivity for cisplatin alone or combined with etoposide. OCT4 KD results were similar to control cells, and SOX2 KD only responded to combination, while NANOG to cisplatin. Taken together, our results suggest that KLF4 and c-MYC analysis might be helpful to detect possible TGCT treatment resistance.

INTRODUÇÃO

1. TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS (TCG)

Tumores de células germinativas testicular (TCGT) são um dos carcinomas mais comum em homens jovens e, apesar da alta incidência, a introdução de quimioterapia utilizando cisplatina nos anos 70 resultou em um grande aumento da sobrevivência dos pacientes, mesmo nos casos com metástase [1,2].

TCGT podem ser divididos, clinicamente, em: (i) **carcinoma *in situ***, CIS, precursor do TCG; (ii) **seminomas**, tumores compostos por células similares as células germinativas primordiais; e (iii) **não-seminomas**, que apresentam tanto células pluripotentes quanto células diferenciadas e são divididos nos seguintes subgrupos: (a) **carcinoma embrionário** (EC), composto por células indiferenciadas com aparência epitelial; (b) **coriocarcinoma**, apresenta uma mistura, em proporções variáveis, de sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto e células trofoblásticas intermediárias; (c) **tumor do saco vitelino** que contém células que recapitulam o saco vitelino, alantoide e mesênquima extraembrionário; e (d) **teratomas** (Figura 1) [1,3].

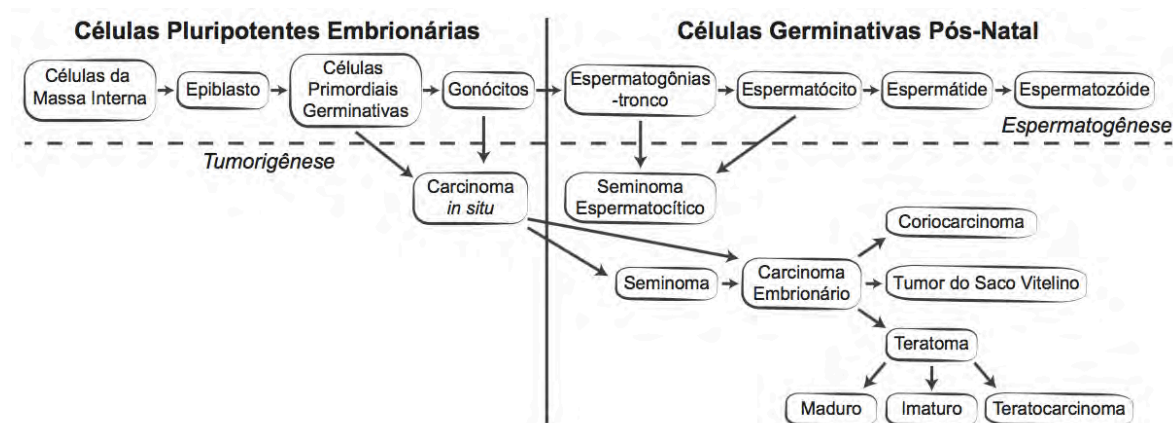


Figura 1| Modelo proposto para a tumorigênese de células germinativas testicular. Alterações podem levar a transformação das células embrionárias em carcinoma, como perda de genes supressores tumorais e duplicação genômica do cromossomo 12, que promovem a progressão para seminoma e carcinoma embrionário. Outras mutações resultam na perda de pluripotência e formam tumores com características mais diferenciadas (coriocarcinoma, tumor do saco vitelino e teratomas). Teratomas podem ser divididos em três subtipos: maduros (composto por células diferenciadas), imaturos (composto por células imaturas, principalmente com componentes neuroepiteliais, podendo ou não apresentar tecidos maduros) ou teratocarcinoma (composto por uma mistura de células de carcinoma embrionário e teratoma). Adaptado de Hart, 2005^[1]; Bustamante-Marín, 2013^[4]; H. Isaacs, 2013^[7].

Uma das características únicas dos TCGT é a amplificação do cromossomo 12p, além de menos de 1 % apresentam mutações em *TP53* [2,3]. Além disso, OCT4 pode ser usado como um marcador específico de TCGT, uma vez que é altamente expresso em pacientes com CIS, seminoma e EC, mas não está expresso em componentes diferenciados dos tumores não-seminoma [3]. Assim como OCT4, NANOG também apresenta o mesmo estilo de expressão [1]. Diferentemente dos outros tumores sólidos, a maquinaria de resposta à dano ao DNA raramente é ativada espontaneamente [2].

Seminomas são relativamente de baixa malignidade enquanto que não-seminomas (NSTCG) apresentam um fenótipo clínico mais agressivo e metastizam mais; entretanto, são menos sensíveis à radioterapia que os seminomas [2,4]. Tumores metastáticos residuais normalmente consistem em tecidos somáticos maduros e completamente diferenciados após quimioterapia de NSTCG. Assim, dois possíveis mecanismos referente a essa diferenciação são propostos: remoção seletiva dos componentes imaturos ou indução direta da diferenciação de células malignas [5].

1.1. Teratomas

Teratomas são TCGT benignos, compostos por diversos tipos celulares derivados dos três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme) presentes de forma desorganizada. Componentes ectodérmicos, epiderme e, principalmente, tecido neuronal, compõe grande parte do teratoma. Células derivadas da mesoderme, como gordura, cartilagem, osso e músculo também estão bastante presentes. Entretanto, componentes endodermiais, células de tecido intestinal / gástrico ou respiratório são pouco comuns [6,7].

Teratomas podem ser classificados em (i) **teratomas maduros**, composto exclusivamente por células diferenciadas, (ii) **tumores imaturos**, composto por células imaturas, principalmente com componentes neuroepiteliais, podendo ou não apresentar tecidos maduros; e (iii) **teratocarcinoma** (Figura 1) [4,6–8].

Teratocarcinomas são TCG malignos compostos por uma mistura de células de carcinoma embrionário e teratoma. Uma característica importante desse tumor é a presença de células tronco tumorais, chamadas de células de carcinoma embrionário (ECCs), consideradas versões malignas das células tronco

embrionária (ESCs) [6]. ECCs apresentam características semelhantes as células pluripotentes embrionária pré-implantação, incluindo a capacidade de proliferação ilimitada. Uma das maiores diferenças é a presença da amplificação do cromossomo 12p, além da superexpressão dos genes presentes na região 12p13, como *NANOG*, *CD9*, *STELLA*, entre outros em ECCs [3].

1.2. A linhagem de carcinoma embrionário murino P19

A linhagem de carcinoma embrionário P19 é derivada de um teratocarcinoma formado após o transplante de um embrião com 7.5 dias no testículo de um camundongo C3WHe adulto [9].

Diversas características propiciam o seu amplo uso e que a fazem um modelo adequado para estudar o desenvolvimento inicial de mamíferos, investigando os mecanismos moleculares que governam a diferenciação, características das células tronco tumorais e desenvolvimento tumoral. Essas células possuem um cariótipo normal, não apresentando nenhuma anormalidade genética; podem ser transfectadas com DNA contendo genes recombinantes, gerando linhagens estáveis expressando o gene; além de serem pluripotentes, ou seja, capazes de se diferenciar em células derivadas dos três folhetos embrionários (ecto, meso e endoderme). Apesar de derivar de um tumor maligno, participam da formação de tecidos normais, quando injetadas em blastocistos, gerando quimeras, ou seja, são capazes de participar das vias normais de diferenciação [10,11].

Além disso, uma característica que a distingue das demais linhagens de carcinoma embrionário é o fato de não diferenciar em alta confluência. Na realidade, a diferenciação dessas células pode ser controlada por compostos não-tóxicos e de forma dose-dependente. Ácido retinóico (RA) é um dos tratamentos mais efetivos para diferenciação das P19, e quando agregados (corpos embrióides) são expostos a altas doses de RA (maior que 10^{-7} M), neurônios e astroglia são observados; em doses intermediárias (aproximadamente 10^{-8} M) poucos neurônios são observados e células da musculatura esquelética são abundantes; e, em baixas doses (10^{-9} M), células da musculatura cardíaca predominam [10]. Outro composto bastante efetivo é o dimetil sulfóxido (DMSO), que na concentração de 0.5 – 1 % (v/v) induz a diferenciação dos agregados em diferentes células derivadas da meso e endoderme. O primeiro tipo celular a

diferenciar são células cardíacas agrupadas realizando contração ritmada, posteriormente, células da musculatura esquelética são observadas [10]. Tratamento com oxitocina e butirato de sódio também foram capazes de induzir diferenciação [10,12]. Além disso, hipóxia é capaz de induzir a diferenciação, sendo neurônios dopaminérgicos o tipo celular predominante [13].

1.3. Tratamento

Apesar do aumento dos casos de TCGT nos últimos anos, esse câncer é um dos com melhores chances de cura, uma vez que o início do uso de cisplatina teve um grande impacto no tratamento, tornando-se um dos tumores sólidos mais curáveis da atualidade [14]. O tratamento ouro atual para TCGT consiste em ciclos com combinação de quimioterápicos, principalmente bleomicina, etoposídeo e cisplatina (BEP), alcançando 90 a 95 % de cura [15].

1.3.1. Cisplatina

Cisplatina (cis-diamino dicloroplatina II, CDDP) é um agente inorgânico platinado formado por um íon de platina que é rodeada por quatro ligantes na posição cis: dois átomos de cloreto e duas moléculas de aminas.

CDDP é um efetivo quimioterápico bastante utilizado, desde os anos 70, no tratamento de diversos cânceres, como testicular, ovário, cabeça e pescoço, e cervical [16–18]. Além de ser muito utilizado em combinação com outras drogas: associado com taxanos e 5-fluoracil em câncer de mama, e com etoposídeo e bleomicina em TCGT [15,18].

Cisplatina forma complexos de platina altamente reativos e carregados. Intracelular, CDDP torna-se biologicamente ativa pela substituição por moléculas de água de um ou dos dois grupos cloreto que se ligam a grupos nucleofílicos, como regiões ricas em CG no DNA, induzindo ligações cruzadas tanto na mesma fita (intrafita) quanto entre as duas fitas distintas (interfita), também pode atuar gerando ligações cruzadas entre DNA e proteína [2,19]. Apesar de poder gerar vários tipos de ligações cruzadas, a preferência de atuação é na formação de adutos covalentes de DNA com a ligação entre guanina-guanina na posição N7 [20].

A ligação de cisplatina na estrutura do DNA afeta o seu uso como molde para a transcrição [20]. Além disso, a citotoxicidade de CDDP correlaciona com a quantidade de platina ligada ao DNA e também pela forma como é captada. Essa captação de CDDP difere entre as diferentes células, por exemplo, em células sensíveis de câncer de ovário, a captação ocorre por difusão passiva e transporte ativo, já nas células resistentes é realizada somente por difusão passiva [20].

Alguns mecanismos celulares atuam com o intuito de defender as células do efeito da cisplatina. Glutathione e metalotioneína, pertencentes ao grupo tiol (sulfidril), detoxificam cisplatina via conjugação; já proteínas contendo cópias do motivo do grupo de alta mobilidade (HMG) são capazes de reconhecer a modificação gerada pela CDDP no DNA, um exemplo desse grupo é SOX2 (ver tópico 2.3); também o reparo dos adutos gerados são principalmente corrigidos via reparo de excisão de nucleotídeos (NER) [2,3,14,20].

Entretanto, apesar da alta resposta ao tratamento com cisplatina, alguns pacientes acabam desenvolvendo resistência ao tratamento [16]. Resistência à CDDP pode ocorrer devido a diversos mecanismos, incluindo redução de acúmulo e aumento do efluxo de CDDP no citoplasma celular. Enquanto que no núcleo, redução da acessibilidade do DNA e aumento da resposta à reparo também podem participar [16,21]. Ainda, o aumento de metalotioneína, glutathione e/ou glutathione-S-transferase e aumento da via NER também estão associadas à resistência à CDDP [16].

Especificamente em TCGT, resistência à CDDP podem ocorrer devido: (i) redução na expressão de OCT4 e falha na indução das proteínas pró-apoptóticas Puma e Noxa; (ii) mudanças na expressão de certos miRNAs (miR-17/-106b, miR-302a, ou miR-371 a 373); (iii) aumento dos níveis de MDM2 e translocação citoplasmática de p21 via fosforilação; e (iv) ativação da via PDGFRb / PI3K / pAKT (Figura 2A) [22].

Diversas características encontradas em TCGT contribuem para a alta resposta ao tratamento com cisplatina, como apresentar baixos níveis de expressão de algumas das proteínas da maquinaria de reparo ao DNA e, assim, permite o acúmulo de danos e ativação da apoptose [3,14]. Os níveis de detoxificantes, como glutathione, são menores nesse tipo tumoral [3].

Opostamente, aumento da expressão de células contendo o domínio HMG correlacionam com a sensibilidade de TCGT, uma vez que reconhecem os adutos intrafita causado pela cisplatina e ligam-se a eles inibindo a atuação de reparo via NER [3]. Além disso, altos níveis de OCT4 correlacionam com a alta expressão de Noxa e baixos níveis de p21 (Figura 2B) [2,23].

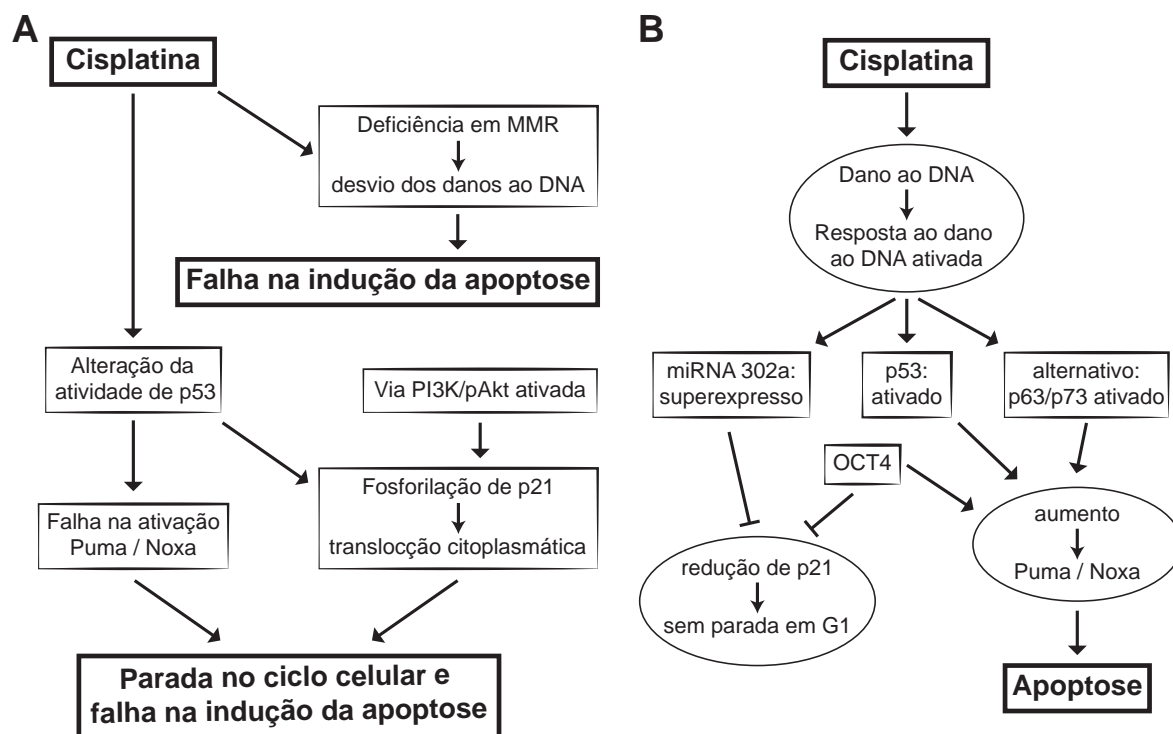


Figura 2| Vias de atuação da cisplatina nos mecanismos de resistência (A) e sensibilidade (B) em tumores de células germinativas (TCG). (A) Deficiência no sistema de reparo por pareamento errado (MMR – *mismatch repair*) pode conduzir a perda do sinal pró-apoptótico ou induzir o aumento da síntese translesão em que há o contorno dos adutos de DNA gerados pela cisplatina, permitindo que as células escapem da apoptose. Além disso, células resistentes à cisplatina apresentam alteração da resposta via p53 levando à (i) ativação de p21, via fosforilação, assim p21 transloca para o citoplasma induzindo parada no ciclo, e (ii) falha em ativar a resposta pró-apoptótica via Puma e Noxa. A ativação de p21 também pode ocorrer devido ao aumento da via PI3K / pAkt. Por intermédio desses mecanismos, células resistentes ativam a parada do ciclo celular na fase G1 / S e evitam a apoptose. (B) Células TCG sensíveis à cisplatina ativam a resposta ao dano ao DNA, levando à apoptose mediada por p53 via indução de Puma e Noxa. A presença de OCT4 aumenta a resposta pró-apoptótica e, paralelamente, altos níveis de OCT4 e do microRNA miR-302a estão ligados a baixa expressão de p21 e falha em ativar a parada do ciclo celular em G1. Os membros da família de p53, p63 e p73, representam uma via alternativa para a indução de apoptose via Puma e Noxa. Traduzido de Jacobsen, 2015^[22].

Cisplatina não só é capaz de reduzir a proliferação de células TCGT, mas também induzir diferenciação das ECCs [24]. Em 2002, Mizutani *et al.* demonstrou que células de carcinoma embrionário humano podem ser induzidas

a diferenciar em teratomas *in vivo* via tratamento de cisplatina (dose de 3 mg/kg). A diferenciação foi associada com redução dos níveis do crescimento tumoral, aumento da expressão de genes pró-apoptóticos e aumento da sobrevivência dos camundongos [5]. Em câncer de mama, também foi observado a redução de marcadores de pluripotência e aumento da expressão de marcadores de diferenciação frente ao tratamento com CDDP [18]. Portanto, a indução de diferenciação terminal pode ser uma via para reduzir os resíduos malignos resistentes [21,25].

1.3.2. Etoposídeo

Etoposídeo (VP-16) é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, uma substância extraída da raiz de mandrágora e usado como terapia padrão para diversos tipos de cânceres: carcinoma pulmonar de células pequenas, linfomas malignos, câncer testicular resistente, leucemia e sarcoma de Kaposi [26,27].

VP-16 exerce a sua atividade tóxica nas células ao se ligar e inibir a ação da enzima topoisomerase II (topo II). Essa enzima é essencial para replicação e transcrição do DNA, segregação da cromatina e recombinação do DNA [28]. VP-16 forma um complexo ternário estável e não reparável com a topo II e a extremidade 5' clivada do DNA. As células reconhecem esse dano e sinalizam para induzir a parada no ciclo na fase G2/M e a ativam apoptose mediada por p53 [26,29–31].

A sensibilidade à apoptose induzida por etoposídeo tanto em ESCs quanto em ECCs, aparenta ser dependente do seu estado de diferenciação. Em teratomas, o tratamento resultou na diminuição de componentes imaturos de tecido neuroepitelial, principal componente dos teratomas com altos índices proliferativos, enquanto que os tecidos com características mais diferenciados mantiveram-se inalterados [28]. Assim, o efeito do VP-16 no crescimento dos teratomas parece ser devido ao fato desse tipo tumoral apresentar altos índices de proliferação, enquanto que os tecidos diferenciados apresentam pouca proliferação [28]. Em ESCs humanas, o tratamento induziu apoptose, aumento da expressão de p53 e PUMA, além de células indiferenciadas OCT4 positivas foram mais sensíveis à apoptose induzida pelo tratamento com etoposídeo do que a sua progênie diferenciada [29]. Em células pluripotente induzidas (iPSC) também

observou-se benefício com o pré-tratamento com VP-16, uma vez que animais injetados com células pré-tratadas tiveram menor número de teratomas, além da redução da massa tumoral nos que conseguiram formar tumor [32].

Resistência à VP-16 pode ser observada em algumas células, podendo ocorrer devido à alteração na expressão e atividade de genes alvo, redução da expressão de topo II ou de genes responsáveis pelo reparo de pareamentos errados (MMR – *mismatch repair*), e, principalmente, devido à presença da glicoproteína-P, codificada pelo gene *MDR1* (resistência à múltiplas drogas), que funciona como uma bomba de efluxo ATP-dependente removendo ativamente a saída do fármaco do interior da célula [3,31].

Resistência à VP-16 também pode ocorrer devido à presença de hipóxia, que altera, diretamente, a privação de oxigênio necessário por algumas drogas para induzir dano ao DNA; ou então, indiretamente, pela modulação de genes responsáveis pela resistência à morte celular [30,33]. Hipóxia teve um efeito protetor à citotoxicidade de VP-16 em neuroblastoma; e, em câncer hepático, reduziu a resposta das células ao tratamento com etoposídeo por, pelo menos, duas vias: redução dos níveis de expressão de p53 e indução da via de pró-sobrevivência, via aumento da expressão de c-jun [30,33].

2. FATORES DE TRANSCRIÇÃO

A regulação da expressão gênica é de extrema importância seja para expressão de tecido específico ou de genes ativados / reprimidos devido a diferentes estímulos, e essa regulação, na maioria das vezes, ocorre à nível transcricional [34]. Fatores de transcrição (*transcription factors* - TFs) são proteínas que se ligam a sequências específicas do DNA, regulando os níveis de transcrição do gene, atuando positiva ou negativamente, podendo realizar a sua função sozinho ou formando complexos com outras proteínas com o intuito de ativar ou reprimir genes específicos [34].

As tabelas I e II resumem as características dos fatores de transcrição comumente expressos nas células indiferenciadas em humanos e em camundongos utilizados nessa tese.

Tabela I. Características dos fatores de transcrição em humanos.

Gene	Localização	Éxons	Isoformas	mRNA	Proteína	Peso	Pg
OCT4 (<i>POU5F1</i>)	Chr 6 (6p21.31)	5	A	1430 pb	360 aa	38 kDa	6
			B-265	2075 pb	265 aa	35 kDa	
			B-190		190 aa	23 kDa	
			B-164		164 aa	20 kDa	
			B1	2300 pb	164 aa	20 kDa	
KLF4	Chr 9 (9q31)	4	1 (a)	3014 pb	513 aa	55 kDa	1
			2	2903 pb	479 aa	51 kDa	
SOX2	Chr 3 (3q26.33)	1	1	2520 pb	317 aa	34 kDa	-
NANOG	Chr 12 (12p13.31)	5	1	2103 pb	305 aa	35 kDa	11
			2	2055 pb	289 aa	33 kDa	
c-MYC	Chr 8 (8q24.21)	3	1	2379 bp	439 aa	49 kDa	-

NCBI, acesso junho/2016. **Abreviaturas:** aa – aminoácidos; chr – cromossomo; pb – pares de base; pg - pseudogene.

Tabela II. Características dos fatores de transcrição em camundongos.

Gene	Localização	Éxons	Isoforma	mRNA	Proteína	Peso	Pg
Oct4 (<i>Pou5f1</i>)	Chr 17 (17 B1; 17 18.69 cM)	6	1	1353 pb	352 aa	38 kDa	19
			2	991 pb	221 aa	25 kDa	
Klf4	Chr 4 (4 B3; 4 29.76 cM)	5	1	3057 pb	483 aa	52 kDa	-
Sox2	Chr 3 (3 16.93 cM; 3 A2-B)	1	1	2480 pb	319 aa	34 kDa	-
Nanog	Chr 6 (6; 6 F2)	7	1	2223 pb	305 aa	34 kDa	3
			2	2220 pb	304 aa	34 kDa	
			3 (1b)*	2020 pb	280 aa	32 kDa	
			4 (1a)*	2004 pb	280 aa	32 kDa	
c-Myc	Chr 15 (15 26.19 cM; 15 D2-D3)	3	a (1)	2399 bp	454 aa	51 kDa	-
			b (2)	2396 bp	439 aa	49 kDa	
			c	2396 bp	453 aa	51 kDa	

NCBI, acesso junho/2016. * As variantes de Nanog 3 e 4 codificam a mesma isoforma, a 3. **Abreviaturas:** aa – aminoácidos; chr – cromossomo; pb – pares de base; pg - pseudogene.

2.1. OCT4

OCT4 (*octamer-binding transcription factor 4*, também chamado de POU5F1 ou OCT3) é um membro da família POU dos TFs que se liga nos motivos de sequências octâmeras (ATGCAAAT) para ativar a expressão dos seus genes alvos [35]. OCT4 é um importante fator durante a embriogênese e essencial para gerar as iPSC (ver tópico 2.6.1) [36,37]. Além disso, uma regulação fina dos seus níveis são fundamentais para a manutenção do estado indiferenciado, uma vez que alta ou baixa expressão resulta em diferenciação celular [36,38].

Localizado no cromossomo 6 (6p21.31), *OCT4* pode gerar três isoformas que compartilham o mesmo domínio POU de ligação ao DNA e C-terminal, mas diferem quanto a região N-terminal, além de apresentar 6 pseudogenes [39–41]. OCT4A é a principal variante atuando no núcleo como um dos mais importantes TFs em células pluripotentes. Já a isoforma OCT4B está localizada no citoplasma e pode gerar três proteínas via tradução alternativa: OCT4B-265, OCT4B-190 e OCT4B-164 [42]. Diferentemente do mRNA de OCT4B, o de OCT4B1, a terceira isoforma de OCT4, caracteriza-se por manter o íntron 2 como um éxon críptico de 233 pb e que contém um códon de terminação TGA [43]. Além disso, OCT4B1 pode perder esse éxon críptico e sofrer *splicing* gerando OCT4B, atuando, assim, como um precursor dessa isoforma [44,45].

OCT4 está expresso durante os estágios iniciais do desenvolvimento, apresentando expressão reduzida a ausente durante a diferenciação das células que formam o trofoblasto. Entretanto, mantém alta expressão nas células que formam a massa de células da camada interna do blastocisto. Posteriormente, durante o desenvolvimento, a diferenciação da ectoderme embrionária em diferentes tecidos depende da rápida diminuição da sua expressão [46–48].

Em cânceres sólidos, OCT4 normalmente está ligado à resistência frente aos tratamentos quimioterápicos, e, após o tratamento, sua expressão encontra-se aumentada como em carcinoma cervical e carcinoma oral escamoso [49,50]. Entretanto, um efeito oposto é observado quanto a expressão de OCT4 e resistência em TCGT, sendo que células positivas mostraram ser mais sensíveis ao tratamento com cisplatina [51–53].

Dentre os subtipos de TCGT, somente os seminomas e carcinoma embrionário apresentam a expressão de OCT4, uma vez que apresentam ECCs; enquanto que coriocarcinomas, teratomas e tumor do saco vitelino não apresentam expressão [23].

Ver capítulo I (“**Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis**” by Villodre ES, Kipper FC, Pereira MB and Lenz G) para mais detalhes sobre OCT4.

2.2. KLF4

O fator de transcrição KLF4 (*Krüppel-like factor 4*) foi descoberto, independentemente, por dois grupos e, por esse motivo, recebeu dois nomes diferentes: GKLF (*gut-enriched Krüppel-like factor*), por apresentar alta expressão no intestino, e EZF (*epithelial zinc finger*) pela elevada expressão no epitélio da pele [54,55].

KLF4 é um membro da família *Krüppel-like factor* caracterizada por codificar uma proteína “zinc finger” e que se liga em sítios muito similares de “GT-box” ou “elementos CACCC” no DNA [56]. Em humanos, localiza-se no cromossomo 9 (9q31), contém 4 éxons e pode gerar 2 isoformas, sendo KLF4a a principal, traduzindo uma proteína de aproximadamente 55 kDa, além de apresentar somente um pseudogene.

KLF4 está localizado exclusivamente no núcleo de diversas células, como células epiteliais do trato intestinal, pele, timo, células endoteliais vasculares, bexiga, pulmão, testículo, córnea, cardiomiócitos e linfócitos [55–60]. Sua expressão está relacionada com diversos processos fisiológicos importantes, como desenvolvimento, diferenciação e manutenção da homeostase dos tecidos normais [60]. Além disso, pode ser induzido por diversos estímulos, como células submetidas à privação de soro, radiação, dano ao DNA, inibição por contato, peróxido de hidrogênio, interferon- γ (IFN- γ), lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral (TNF), entre outros (Figura 3) [60–62].

KLF4 pode atuar ativando ou reprimindo a transcrição dos seus genes alvo. Além de ser capaz de regular sua própria expressão ligando ao seu promotor [60,63]. E, em ESCs, é regulado via Erk1 ou Erk2, em que essas proteínas se ligam ao domínio de ativação de *KLF4* e o fosforilam diretamente na posição

Ser123. Essa fosforilação suprime a sua atividade com consequente indução da diferenciação dessas células [64]. Sua expressão também está envolvida no comprometimento das células pluripotentes para a diferenciação endodermal, uma vez que a ausência de expressão aumenta a diferenciação em direção à endoderme definitiva [65]. Também é capaz de promover a autorrenovação de ESCs via ativação dos genes de pluripotência, como *NANOG*, *OCT4* e *SOX2* [66].

A primeira função descrita para KLF4 foi promover a parada da progressão do ciclo celular de fibroblastos *in vitro*, na qual células proliferando ativamente apresentam baixa expressão; entretanto, quando as células são induzidas a parar no ciclo, seja por privação de soro ou inibição por contato, a sua expressão aumenta [55]. O mesmo grupo observou que KLF4 está expresso especificamente em células epiteliais diferenciadas intestinais e da pele, demonstrando a sua função regulatória durante a diferenciação terminal de células epiteliais [55].

A progressão do ciclo celular é dirigida pelas ciclinas e suas respectivas Cdk (cinases dependente de ciclinas). Inversamente, a parada do ciclo é regulada pelos inibidores das Cdk (ex.: p16^{ink4a}, p21^{Cip1/Waf1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}) [63]. Após um estresse celular, p53, um supressor tumoral, é ativado via fosforilação e auxilia na ativação de diversas outras proteínas, como p21. p21, por sua vez, inibe a atividade de diversos complexos ciclinas-Cdk (ciclina D1-Cdk4, ciclina E1-Cdk2, e ciclina A-Cdk2) que resulta na parada no ciclo celular com o intuito de corrigir o dano e assim manter a estabilidade genômica. KLF4 é capaz de induzir p21, pois consegue se ligar e, diretamente, transativar o promotor de p21, uma vez que este contém o sítio do “elemento CACCC”, além de interagir fisicamente com p53, gerando uma indução sinérgica de p21 via p53 [57,56,59,67]. Assim como p53, KLF4 tem uma importante função em resposta à dano ao DNA com o intuito de evitar a progressão do ciclo de células contendo danos não reparados no DNA [63].

Outra função importante desse gene é de manter a barreira proteica/lipídica da pele intacta. Essa barreira auxilia na proteção à desidratação e a agentes tóxicos, além de proteger a pele de estresses físico e mecânico. Camundongos *knockout* para KLF4 morrem logo após o nascimento devido a alterações nas estruturas de

diferenciação final dessa barreira, demonstrando a sua importância na diferenciação celular [58].

KLF4 apresenta um caráter dualístico em relação a tumorigênese, uma vez que possui potencial para mudar de supressor tumoral, inibindo o crescimento celular, para oncogene, em que promove a proliferação em resposta a mudanças do contexto celular [68]. Como supressor tumoral atua bloqueando a proliferação celular e em diversos tumores ocorre perda da sua expressão. Um dos primeiros estudos a demonstrar a capacidade supressora tumoral foi em câncer intestinal, em que houve redução da sua expressão durante a tumorigênese [69]. Em células de carcinoma de cólon, observou-se que a expressão de KLF4 pode ser induzida por IFN- γ , promovendo inibição do crescimento e apoptose, e essa indução foi independente de p53 [70]. Katz *et al.* observou que a sua perda induz mudança na estrutura do epitélio gástrico e camundongos com KLF4 mutado apresentam aumento no número de lesões pré-malignas. Além disso, redução na sua expressão foi observado em amostras de cânceres gástrico e intestinal [71]. Em malignidades derivadas de células B ou células transformadas com o oncogene ABL observou-se o mesmo efeito, uma vez que apresentaram baixos níveis de KLF4 e a indução da sua expressão bloqueia a transformação, inibe proliferação e induz morte celular [72]. Além desses tumores, a mesma função foi vista em câncer de estômago, esôfago, bexiga e pulmão [56,60,63,73–75].

De forma oposta, KLF4 pode atuar como oncogene, sendo bastante expresso em alguns tumores. Viu-se que em 70 % dos casos de carcinoma de mama sua expressão está elevada. Essa mesma função foi vista em câncer de orofaringe e cérebro [56,60,63,73–75]. Assim, um modelo para explicar esse efeito dualístico de KLF4 em câncer foi proposto (Figura 3).

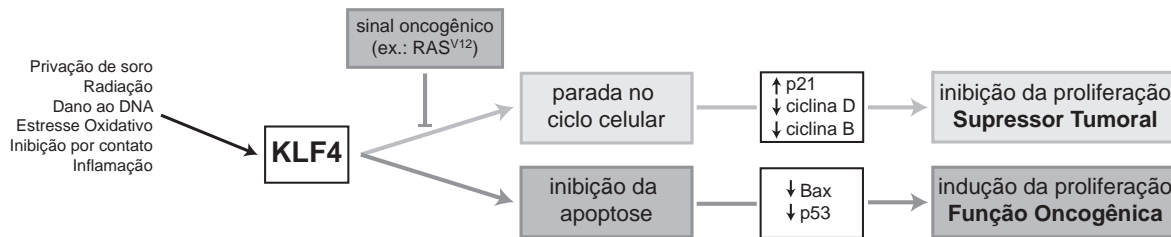


Figura 3| Modelo da atuação de KLF4 na tumorigênese. KLF4 pode ser ativado por diferentes estímulos que, dependendo do contexto e tipo tumoral, permite a sua atuação como supressor tumoral ou como oncogene. KLF4 inibe a proliferação, através da parada do ciclo celular dependente de p21. Quando ocorre um sinal oncogênico, como presença de RAS^{V12}, que inibe a expressão de p21 via ciclina D, permite que KLF4 atue bloqueando p53 e assim induzindo a proliferação dessas células. Adaptado: McConnell, 2007^[60]; Evans, 2008^[63]; Zheng, 2010^[62].

KLF4 também está envolvido na resistência tumoral frente a diversos quimioterápicos. Células tronco tumorais (CSCs) de hepatocarcinoma, que apresentam maiores níveis de KLF4, foram mais resistentes à cisplatina do que células com característica mais diferenciada [76]. Já a superexpressão de KLF4 em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço aumentou a capacidade de migração, invasão e resistência a diversas drogas (como cisplatina, docetaxel e 5-fluoracil (5-FU)), além de aumentar a sua tumorigenicidade *in vivo* [77]. Em osteosarcoma, a sua expressão também foi aumentada após o tratamento com cisplatina, metotrexato e doxorrubicina [78]. E, em MCF-7, uma linhagem de câncer de mama, uma maior expressão de KLF4 foi observada em células que eram resistentes à cisplatina comparadas com as não-tratadas [79].

A regulação da expressão de KLF4 pode ser influenciada pela ação de microRNAs (miRNAs, miR), que são pequenas moléculas endógenas de RNA (~ 19 a 21 nucleotídeos) importante na regulação pós-transcricional da expressão gênica, atuando no mRNA alvo a partir do pareamento com a sua região 3'UTR, tendo como resultado degradação desse mRNA (complementariedade suficiente com o miRNA) ou inibição da tradução (não apresenta complementariedade suficiente para degradação mas com alguma complementariedade ao miRNA) [80,81]. miRNAs podem atuar em diversos processos celulares e, inclusive, alterações da expressão estão presente em diversos tipos de cânceres, podendo atuar tanto como supressores tumorais ou como oncogenes [82].

miR-7 é capaz de regular KLF4 e, dependendo do tipo tumoral, pode funcionar induzindo (indiretamente via degradação de um inibidor) ou reprimindo a

sua expressão. Por exemplo, induz proliferação e migração em queratinócitos humanos não diferenciado e adenocarcinoma alveolar [81]. Enquanto que, em CSCs de câncer de mama, a sua expressão apresentou efeito diverso quanto capacidade metastática dessas células, aumentando a metástase para o osso e reduzindo para o cérebro [83]. Em CSCs de próstata, miR-7, via regulação de KLF4, aboliu as características tronco dessas células que apresentaram um menor potencial tumorigênico [84].

Outro miRNA envolvido na regulação de KLF4 é o miR-152. CSCs de gliomas (GSCs) apresentam níveis reduzidos desse miR, enquanto que KLF4 encontra-se aumentado (alta expressão é característico de função oncogênica desse gene em GSCs). E, ao superexpressar miR-152 resultou em inibição da proliferação, da invasão e da indução de apoptose [74].

Em carcinoma gástrico, KLF4, cuja função é de supressor tumoral, é alvo de miR-32. Esse miRNA está presente em altos níveis nesse tipo tumoral e promove não só a proliferação dessas células, mas também migração e invasão [85].

Em câncer colorretal, miR-375 apresenta expressão reduzida e atua como supressor tumoral, e ao ser superexpresso reduz a proliferação e capacidade tumorigênica dessas células [86].

2.3. SOX2

SOX2 é um TF membro da família dos genes SOX (*SRY-related high mobility group box*). Uma característica dessa família é a presença de um domínio de alta mobilidade (*high mobility group*, HMG) e apresenta alta identidade com o presente no gene determinante de sexo, *SRY* [87]. Esse TF apresenta 3 domínios principais: N-terminal, HMG e domínio de transativação, sendo HMG o responsável pela ligação de SOX2 ao DNA, que reconhece o motivo consenso 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3', assim, sendo capaz de atuar na regulação de diversos genes [88,89].

Localizado no cromossomo 3 (3q26.33), contém apenas 1 éxon e gera uma proteína de 34 kDa. Apesar de não apresentar isoformas e ter somente um transcrito, as suas diferentes funções são exercidas devido a modificações traducionais (controlada por miRNAs) ou pós-traducionais (como fosforilação, ubiquitinação, metilação, entre outros) [90].

Interações entre genes regulatórios e genes alvos geram uma rede regulatória transcricional. Esses alvos apresentam regiões cis regulatórias (*enhancers*) que são capazes de responder e integrar múltiplos sinais dos genes regulatórios, muitos dos quais codificam fatores de transcrição. Os *enhancers* dentro do próprio gene regulador permite um controle mais preciso e complexo de toda essa rede [91]. Assim, observou-se que SOX2 é regulado transcricionalmente por um *enhancer* contendo o elemento de reconhecimento SOX-OCT (HMG-POUF) que se ligam para a ocorrência de uma interação combinatória [92]. Além disso, a ligação de SOX2 ao DNA é mais fraca comparada com outros TFs clássicos, requerendo, outras proteínas para formar um complexo DNA-proteína estável [93]. Dessa forma, dependendo com qual proteína forma o complexo SOX2 pode exercer diferentes funções e, da mesma forma que KLF4, também contribui para ativação de seu próprio transcrito [91].

Durante o desenvolvimento embrionário, SOX2 é inicialmente presente tanto na camada de células interna (ICM) quanto na trofoectoderme (TE) e, posteriormente, mantém-se somente na ICM. Essa modificação da expressão é necessária para que ocorra a segregação da TE e ICM, uma vez que mutantes nulos não conseguem gerar as linhagens embrionárias e da trofoectoderme [94,95]. Além disso, está envolvido na manutenção e/ou proliferação de ESCs e células tronco neurais, em que são altamente dependentes dos níveis de expressão de SOX2 [90,96,97]. Ciclina D1 é um de seus alvos para induzir a proliferação, auxiliando na promoção da transição de G0/G1 para a fase S do ciclo celular [92].

Também atua em diversos processos importantes para o desenvolvimento do câncer, regulando diversas vias (revisado por Liu, 2013 [90]): promove a proliferação celular (câncer de mama, próstata, pâncreas e cervical); evasão de sinais apoptóticos (câncer próstata, gástrico e pulmão); migração, invasão e metástase (melanoma, colorretal, glioma, gástrico, ovário e fígado); manutenção da tumorigenicidade e da pluripotência [89,90]. Encontra-se superexpresso, em câncer, geralmente devido a amplificação gênica, e atua como oncogene em próstata, glioblastoma, osteosarcoma, pulmão, trato gastrointestinal, esôfago e

mama [88,90,92,94,98–103]. Altos níveis de sua expressão correlacionam com maior grau tumoral de câncer de mama, cervical e carcinoma pancreático [87,93].

Em câncer de mama, SOX2, junto com β -catenina, é capaz de promover a proliferação celular e tumorigênese por intermédio da regulação de ciclina D1, facilitando a transição de G1/S do ciclo celular [93]. Em células de glioma, a expressão de SOX2 é necessária para a contínua proliferação dessas células. E, surpreendentemente, o silenciamento desse gene em GSCs só apresentou efeito com o decorrer do tempo, ou seja, logo após o silenciamento nenhum efeito drástico nos níveis de apoptose, senescência ou diferenciação foi observado. Entretanto, ao longo das semanas, essas células “desapareceram” da cultura, levando a uma redução na sua tumorigenicidade [104]. Em câncer de ovário, observou uma progressão na expressão de SOX2 de tumores benignos a malignos, indicando que pode estar envolvido na sua progressão [105].

Em sarcoma de Ewing's, é altamente expresso e é capaz de regular a progressão do ciclo (via regulação de p21, p27 e ciclina E) e apoptose (bloqueando tanto via intrínseca quanto extrínseca), e, a sua inativação, via shRNA, foi capaz de inibir a tumorigênese *in vivo* [106]. Também está expresso em células do neuroepitélio primitivo em teratomas imaturos do sistema nervoso central; enquanto que, em teratomas maduros, a expressão de SOX2 é limitada ao epitélio com origem endodermal [96].

Câncer gástrico parece ser a exceção na função de SOX2 em câncer, atuando como supressor tumoral. Menores níveis de expressão foi visto em amostras de câncer comparado com a mucosa normal [107–110]. E quando superexpresso promove inibição no crescimento celular, além de reduzir os níveis de migração e invasão dessas células, via aumento de p21 [109,111].

Resistência à terapia também está correlacionado devido a presença de SOX2 em alguns tumores. Células de câncer de mama resistentes à tamoxifeno são enriquecidas em CSCs contendo altos níveis de SOX2. E, ao silenciá-lo, houve redução dessa população e aumento da sensibilidade dessas células ao tratamento [112]. Resultados semelhantes com células resistentes à paclitaxel também foi visto em câncer de ovário [113]. Em gliomas, altos níveis de SOX2 auxiliam na resistência à temozolomida e, tratamento com rapamicina reduziu os

níveis de SOX2; assim, combinar rapamicina ao tratamento com temozolomida aumentou a eficiência desse quimioterápico *in vivo* [114].

Quanto à resistência à radiação, observou-se, em câncer de pâncreas e em carcinoma cervical, que pacientes resistentes apresentaram maiores níveis de SOX2 comparado com o grupo sensível [49,115]. E células de carcinoma oral silenciadas aumentaram a sensibilidade à combinação terapêutica de cisplatina e radiação, além de suprimir a tumorigênese *in vivo* [116].

Diversos miRNAs que atuam como supressores tumorais e regulam SOX2 estão com expressão reduzidas em cânceres. Por exemplo, miR-638 apresenta níveis reduzidos em colorretal e pulmão, resultando em aumento de SOX2 que atua promovendo o crescimento tumoral [117,118]. Também em câncer colorretal, baixa expressão de miR-450b-5p permite que SOX2 atue na resistência à 5-FU [119]. Já em câncer pancreático miR-1181 regula SOX2, inibindo as características tronco de células pancreáticas e reduzindo a tumorigenicidade [120]. Interessantemente, estimular a via de sinalização do receptor de estrógeno em células de câncer de mama positivas para esse receptor resulta em redução na expressão de miR-140, aumentando a expressão de SOX2 [121]. Entretanto, miRNAs também atuam como oncogenes, e, em câncer gástrico cujos baixos níveis de SOX2 correlacionam com pior prognóstico diferentemente dos demais tumores, miR-126 está superexpresso, reduzindo os níveis de SOX2 e auxiliando na carcinogênese gástrica [122].

2.4. NANOG

NANOG foi descrito simultaneamente por Chambers e Mitsui como um gene responsável em manter a capacidade de autorrenovação de células embrionárias independente de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor* – usado para manter a divisão simétrica de células embrionárias de camundongo), diferentemente de outros genes que dependem desse fator para manter a pluripotência [123,124].

Uma rede interligada de diferentes fatores que se autorregulam e suportam a sua expressão e de outros genes é necessária para manter a pluripotência e a capacidade de autorrenovação de células embrionárias [125]. NANOG consegue ligar ao seu promotor e regular sua própria transcrição, positivamente, cooperando com OCT4 e SOX2, que se ligam ao elemento OCT/SOX presente no

seu promotor; ou negativamente, interagindo com Zfp281, ligado ao complexo repressor NuRD. Já p53 liga-se ao promotor de *NANOG* para reprimir a sua expressão em resposta à dano ao DNA [125–128]. *NANOG* também atua mantendo a indiferenciação celular através da repressão de genes que promovem a diferenciação, como *GATA4* e *GATA6* [124]. Além disso, enquanto que *OCT4* tem como principal função evitar a diferenciação para trofoectoderme das células da ICM e ESCs, *NANOG* previne a diferenciação em endoderme. E por apresentar essa importante função, é regulado tanto por fatores extrínsecos (*LIF*, *HEDGEHOG*, *HIF*, entre outros) quanto intrínsecos (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *GLI*, *p53*) (Figura 4) [123,124,129].

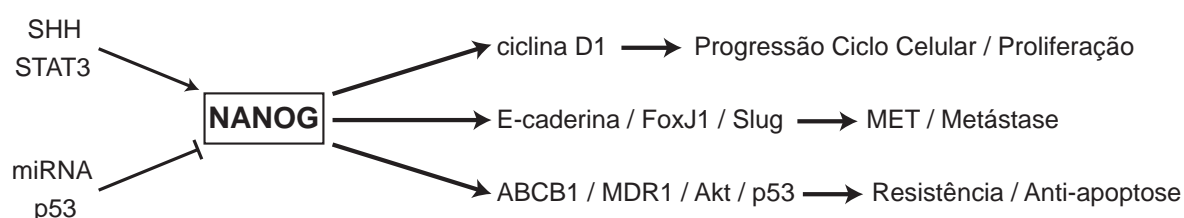


Figura 4| Vias de regulação de *NANOG*. *NANOG* pode ser ativado por diversos genes, sendo a via *SHH* (*sonic hedgehog*) e *STAT3* (*signal transducer and activator of transcription 3*) bastante descritas por auxiliarem na manutenção da pluripotência. microRNAs (*miRNA*) e *p53* atuam bloqueando a sua expressão. Essas regulações permitem que *NANOG* atue induzindo ou inibindo o seu efeito pró-tumorigênico, atuando na proliferação, transição mesênquima-epitélio (*MET*), na indução de metástase, além de atuar na resistência a diversos tratamentos. Traduzido de Wang, 2013^[27].

Localizado no cromossomo 12 (12p13.31), *NANOG* contém 4 éxons e apresenta duas isoformas: *NANOG1* (ou *NANOGa* – isoforma predominante) e *NANOG2* (ou *NANOGb*), traduzindo uma proteína de 35 kDa formada por 3 domínios: N-terminal e C-terminal, que possuem função transativadora, sendo a C-terminal a principal; e, entre eles, o homeodomínio, que apresenta o motivo de ligação ao DNA [125–127].

11 pseudogenes foram descritos para *NANOG*, sendo *NANOGP8* (localizado no cromossomo 15 de humanos) o mais recente e considerado como retrogene, uma vez que manteve a capacidade de gerar uma proteína funcional [129]. A proteína de *NANOGP8* diferencia apenas em um único aminoácido de *NANOG1* e, por esse motivo, são indistinguíveis em análises via western blot ou imunomarcação [129–131]. Ao comparar a expressão desses dois genes,

observou-se que NANOG1 está mais expresso em tumores germinativos, câncer colorretal e leucemias, enquanto que NANOGP8 foi detectado mais em carcinomas (próstata, mama e cólon) [132,133]. Além disso, diferentemente do gene parental, NANOGP8 geralmente não está expresso em tecidos normais [134].

Em câncer, NANOG atua como um potente oncogene capaz de induzir a transformação celular, uma vez que ao superexpressá-lo em células HEK (células humanas de rim embrionário) ocorreu um aumento não só da proliferação celular, mas também da formação tumoral *in vivo* [135]. Entretanto, em câncer de mama, não é um fator inicial na tumorigênese; mas coopera com outros oncogenes, como Wnt-1, para induzir e acelerar a formação tumoral [136]. Além disso, assim como KLF4 e SOX2, regula o ciclo celular por se ligar ao promotor de ciclina D1, promovendo a proliferação [137].

Para diversos tumores a sua presença correlaciona ou com a progressão da doença e pior prognóstico (carcinoma oral; ovário, colorretal, câncer gástrico, fígado) ou caracteriza estágios iniciais (pulmão e câncer gástrico) [138–146]. Além disso, sua expressão está aumentada em outros cânceres, como cervical, adenocarcinoma endometrial e mama [147–149]. Diversos estudos mostram que não só a sua expressão sozinha, mas sim em conjunto com OCT4 é importante para tumorigênese, metástase e resistência, além de apresentar um pior prognóstico para câncer oral, pulmão e pancreático [138,150,151].

A alta expressão de NANOG induz proliferação, migração e invasão das células tumorais, também auxiliando na manutenção da capacidade de autorrenovação de CSCs [141,142,149,152,153]. Em tumores de células germinativas, é expresso mais em tumores com características indiferenciadas, como carcinoma *in situ*, carcinoma embrionário e seminomas; enquanto que tumores mais diferenciados, teratomas e tumores do saco vitelino, está pouco expresso ou ausente [1].

NANOG é detectado no núcleo das células, mas, interessante, em células do microambiente estromal de câncer cervical observou a presença citoplasmática dessa proteína [132]. Tumores são compostos não só pela população de células transformadas mas também pelo microambiente que auxilia

tanto na iniciação quanto na progressão, metástase e resistência tumoral. Um dos principais componentes desse estroma são as células tronco mesenquimais (MSCs) e essas células foram a maior fonte de células NANOG-positivas citoplasmática, promovendo a progressão do câncer cervical [132].

Um grande desafio nas análises desse fator é diferenciar a proteína de NANOG1 humano do seu retrogene NANOGP8, por se diferirem em apenas um aminoácido, ocorrendo a substituição da glutamina por histidina no aminoácido 253 (Q253H) [130,131]. Assim, observou-se que em câncer colorretal, glioblastoma e próstata a alta expressão de NANOG é derivada do mRNA de NANOGP8 [133,154,155]. E em câncer de cólon ocorre a expressão diferencial dos dois genes, assim, contribuindo para manter a sua alta expressão alta, promovendo proliferação e formação tumoral [129].

Quando superexpresso, NANOG auxilia na resistência a diversos fármacos, como à cisplatina (esôfago, carcinoma de cabeça e pescoço, ovário), à doxorrubicina (fígado) e à tamoxifeno (mama). Também regula a expressão de genes associados à resistência como membros da família ABC (ABCB1) e MDR1 (gene de resistência a múltiplas drogas) [127,156–159].

miRNAs podem regular NANOG e evitar os efeitos tumorigênicos desse gene. miR-134, importante para o diferenciação do sistema nervoso central durante o desenvolvimento, suprime a sua expressão para que ocorra o desenvolvimento neuronal. Entretanto, em glioblastoma, esse miRNA apresenta baixa expressão, enquanto que em tecidos normais encontra-se com alta [160]. E ao superexpressar miR-760 em células de câncer de mama, ocorre redução da expressão de NANOG e redução da proliferação e da capacidade metastática [161].

2.5. c-MYC

O gene *c-MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) encontra-se no cromossomo 8 (8q24.21) e consiste em 3 éxons, sendo que o primeiro éxon não é codificado, enquanto que os éxons 2 e 3 representam a região codificante desse gene [162]. A sua tradução gera uma proteína rica em prolina, contendo 439 aa e com peso predito de 49 kDa; mas, em SDS-PAGE, c-

MYC corre agrupado e apresenta um peso molecular aparente de 62/64 kDa [163].

c-MYC faz parte da família de TFs nuclear que contém os motivos hélice-volta-hélice e zíper leucina [162]. E para exercer sua função e ligar efetivamente à sequência E-box (5'-CACGTG-3') do DNA alvo, é necessário formar um heterodímero com outros TFs e recrutar outras proteínas (co-fatores transcricionais) para regular a expressão dos genes alvos; ativando-os ao se ligar com MAX ou MAD, ou reprimindo-os ao se ligar com MIZ1, SP1 e YY1 [162,164-167]. Além disso, é um ativador transcricional fraco e atua amplificando a expressão de genes que já estão com seus promotores ativos [166].

c-MYC é um potente proto-oncogene capaz de regular milhares de genes envolvidos nos mais diversos processos celulares, como proliferação celular (replicação e síntese proteica), diferenciação, apoptose, metabolismo, angiogênese e reparo à dano ao DNA [162,164,168]. Devido ao seu grande potencial tumorigênico, é finamente regulado em células normais tanto transcricional quanto pós-transcricionalmente [165]. Desse modo, o aumento na sua expressão é associado com crescimento celular e divisão descontrolados (ativação direta ou indireta da expressão de genes que governam o ciclo celular e repressão de inibidores do ciclo), aumento da regulação de vias pró-apoptóticas e metástase; enquanto que a perda da expressão reduz o crescimento e promove diferenciação, além de sensibilizar as células à dano ao DNA [162,169].

O papel de c-MYC em câncer foi primeiramente identificado em linfoma de Burkitt e é o oncogene mais comumente ativado e está desregulado em aproximadamente 70 % dos tumores, como leucemia, glioblastoma, mama, pulmão, ovário e cólon [164,167,170,171]. Translocação cromossomal, amplificação gênica e mutações nas vias de sinalização são algumas das formas que podem promover a superexpressão, independente do estímulo de fatores de crescimento, e levar a uma proliferação descontrolada com consequente tumorigênese [172]. Entretanto, a superexpressão sozinha é incapaz de induzir proliferação celular ou transformação neoplásica na maioria das células humanas normais [171,173].

O seu potencial tumorigênico envolve regular tanto a RNA polimerase I quanto a II em diferentes níveis, aumentar a biogênese de ribossomos e a capacidade de transdução que fornecem a célula as proteínas necessárias para aumentar o crescimento celular e, subsequente, a divisão celular [174]. Também é capaz de gerar mudanças no microambiente tumoral, incluindo a ativação da angiogênese e suprimir a resposta imune [171].

Em câncer de mama a sua amplificação é observada em estágios avançados do desenvolvimento tumoral, e foi observada somente em células invasivas, enquanto que células normais ou hiperplásicas não apresentaram alterações de c-MYC ou no cromossomo 8 [175–177]. Ou seja, a presença desse gene parece estar mais associado com a progressão da doença e pior prognóstico do que o desenvolvimento tumoral [175,176,178,179]. Entretanto, no subtipo *basal-like* observou-se que c-MYC pode atuar como supressor tumoral e inibir a invasão celular e metástase, além de regular positivamente a atividade de BRCA1 (*breast cancer 1* - supressor tumoral normalmente alterado em câncer de mama) [177,180]. Em câncer de ovário também foi observado a presença da amplificação e pacientes que responderam ao tratamento quimioterápico apresentavam alta expressão [181–183]. E, em câncer de cólon, a sua presença correlaciona com tumores mais indiferenciados e proliferativos [184].

Alta expressão de c-MYC está presente em diferentes tipos tumorais resistentes e a combinação de quimioterápicos com o seu silenciamento resultam em aumento da sensibilidade em câncer de cabeça e pescoço (associado com CDDP), leucemia (RA, citarabina, daunomicina ou doxorubicina) e câncer gástrico (CDDP, vincristina e 5-FU) [185–187]. Em células de melanoma e câncer de ovário, a combinação de cisplatina e silenciamento exerceram efeito antiproliferativo em cultura e redução do tamanho tumoral *in vivo* [188,189]. Em glioblastoma, a via c-MYC/miR-29c/REV3L auxilia na regulação à resistência à temozolomida, e a sua desregulação está associada com pacientes com tumores mais agressivos e que logo desenvolvem resistência [190]. Já em câncer de cólon, células resistentes à 5-FU apresentam alta expressão de c-MYC, que regula a expressão de ABCB5, um gene da família MDR [191]. Entretanto, para meduloblastoma e câncer pancreático, a superexpressão apresenta resultado

oposto aos demais tumores, uma vez que o aumento de c-MYC sensibilizou as células à CDDP, ao VP-16 e a outros quimioterápicos, aumentando os níveis de apoptose e reduzindo a proliferação [192,193].

Assim como os demais TFs, c-MYC também sofre regulação via microRNAs. miR-145 (em câncer de pulmão, oral, esôfago e ovário) e miR-494 (em câncer gástrico, pancreático e ovário) são alguns dos descritos atuando como supressor tumoral e encontram-se com baixa ou ausente expressão em câncer. Ambos têm como um de seus alvos c-MYC e, quando superexpressos, atuam na redução da expressão desse gene, reduzindo a proliferação, invasão, além de reduzir o crescimento tumoral [194–200]. Interessantemente, p53 induz a expressão de miR-145, permitindo-o reprimir a expressão de c-MYC [201].

2.6. Rede integrada dos fatores de transcrição

A literatura traz amplos dados demonstrando a importância dos TFs OCT4, KLF4, SOX2, MYC e NANOG durante o desenvolvimento embrionário, mantendo a pluripotência ou induzindo a diferenciação; na manutenção de células tronco tumorais e na formação de células pluripotente induzidas. Entretanto, eles não atuam sozinhos, mas sim funcionam em complexos combinatórios para regular a expressão de *loci* que estão envolvidos na manutenção da pluripotência e da diferenciação celular [202].

SOX2 e OCT4 juntamente com NANOG trabalham cooperativamente em uma rede transcricional interdependente para estimular a transcrição não só de seus próprios genes, mas também a expressão de outros genes chaves necessários para a embriogênese incluindo FGF4 e Zfp42/Rex1 [91,202]. Também compartilham diversos genes alvos, assim, ativando e mantendo a expressão de genes envolvidos na autorrenovação, enquanto que, simultaneamente, reprimem genes que medeiam a diferenciação [202]. KLF4 é capaz de interagir diretamente tanto com OCT4 quanto com SOX2, via estrutura *zinc finger* presente na parte C-terminal, além de ser requerido para ativar a transcrição de NANOG [203].

A manutenção da pluripotência e indução da diferenciação é dependente também de níveis exatos de OCT4 e de SOX2, uma vez que tanto a baixa quanto a alta expressão induz a diferenciação de ESCs [36,204]. Essas células se diferenciam em endoderme e mesoderme quando pequenos aumentos (~ 2 x) dos

níveis de OCT4 ocorrem. A indução da diferenciação em células de ectoderme, mesoderme e trofoectoderme, ocorrem quando os níveis de SOX2 aumentam (~ 2 x), com ausência de células derivadas da endoderme. E, quando os níveis de OCT4 ou SOX2 reduzem, há a promoção da diferenciação para células da trofoectoderme [204].

SOX2 é apontado como um dos genes centrais na via da embriogênese, manutenção da autorrenovação e pluripotência. Quando em níveis normais, SOX2 e OCT4 ativam a transcrição dos seus genes alvos; quando somente os níveis de SOX2 aumentam, ocorre uma inibição da expressão de seus alvos; enquanto que, quando o aumento é somente de OCT4, é observado inibição da sua própria expressão e também de NANOG. E, altos níveis de NANOG, resultam apenas na sua própria inibição e de nenhum gene alvo de SOX2 e OCT4 [91]. Apesar da expressão de NANOG não ser essencial para o estabelecimento da pluripotência de ESCs, parte da sua função é manter a capacidade de autorrenovação destas células e a sua presença é capaz de suprimir a diferenciação [202]. Além disso, alterações na expressão de NANOG é uma das consequências funcionais dos níveis flutuantes de OCT4, sendo que baixos níveis aumentam a expressão de NANOG, enquanto que altos níveis de OCT4 resultam na diminuição da sua expressão [202].

A importância da interação desses TFs também é observada quando se analisa a sobrevivência de pacientes. Por exemplo, alta expressão de OCT4 e NANOG foi associada com a carcinogênese pancreática [205]. E, o silenciamento duplo desses dois genes resultou em redução na proliferação, migração, invasão, quimiorresistência e tumorigênese em câncer pancreático tanto *in vitro* quanto *in vivo* [151]. A baixa expressão conjunta de SOX2, KLF4 e BRACHYURY demonstrou estar associado à sobrevida e metástase em pacientes com carcinoma oral de células escamosas [206].

2.6.1. Células Pluripotente Induzidas

Em 2006, Takahashi e Yamanaka demonstraram que células fetais e adultas de camundongo podem ter o seu estado diferenciado alterado pela expressão de quatro fatores de transcrição (OCT4, KLF4, SOX2 e c-MYC, denominados Fatores de Yamanaka - YF), reprogramando uma pequena fração destas em células

pluripotente induzidas (*induced Pluripotent Stem Cells* - iPSC) [37]. E, em 2007, o grupo de Thomson gerou células iPSC utilizando outra combinação de fatores, substituindo KLF4 e c-MYC por NANOG e LIN28 [207]. Posteriormente, observou-se que p53 auxilia na redução da eficácia da reprogramação, por se ligar ao promotor de NANOG e inibir a sua expressão e induzindo a diferenciação [208].

Um dos problemas da reprogramação é a sua baixa eficiência (0,01 – 1 % em média) [209]. Porém, nesses últimos 10 anos de pesquisa, têm-se tentado aumentar esses índices, seja com a combinação com outros fatores, silenciamento de p53, uso de miRNAs, além de diferentes formas de entrega dos fatores ou uso de pequenas moléculas como ácido valpróico e butirato de sódio (Figura 5) [209–211].

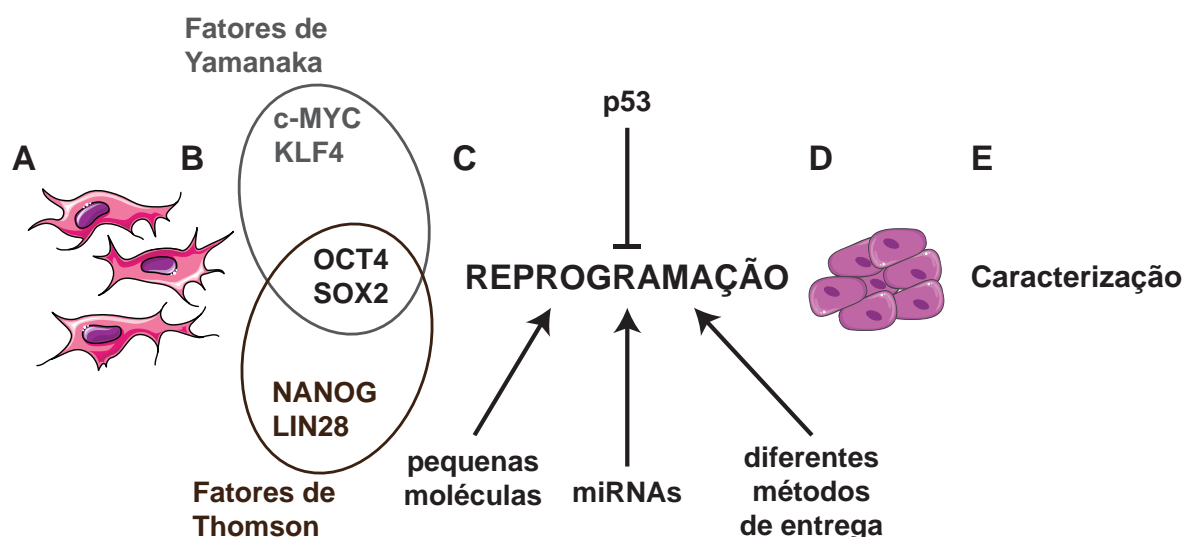


Figura 5| Via para formação das células pluripotentes induzidas (iPSC). (A) Fibroblastos ou outras células-alvo são utilizadas para receber (B) os fatores de transcrição para a indução da reprogramação. Diferentes combinações podem ser utilizadas, sendo as mais comuns: os Fatores de Yamanaka (c-MYC, KLF4, OCT4 e SOX2) e os Fatores de Thomson (NANOG, LIN28, OCT4 e SOX2), sendo entregues, tradicionalmente, via sistema retroviral. (C) Para uma melhor eficiência na reprogramação, diferentes metodologias são propostas: silenciamento de p53, uma vez que bloqueia a expressão de NANOG, diminuindo a eficácia da formação de iPSC; utilização de pequenas moléculas, como ácido valpróico e butirato de sódio; uso de miRNAs; ou então diferentes métodos de entrega dos fatores de reprogramação, integrativos ou não. (D) Formação das colônias reprogramadas com o decorrer dos dias passam para a etapa de caracterização para a confirmação do sucesso da reprogramação. (E) Diferentes ensaios são realizados para caracterização das colônias, tanto *in vitro* como *in vivo*, por exemplo marcação com fosfatase alcalina, RT-PCR, imunofluorescência e formação de teratomas. Adaptado de Singh, 2015^[209].

Dentre os YFs, c-MYC atua potencializando a reprogramação e aumenta a eficiência, entretanto pode ser removido, principalmente pois sua presença

aumenta a capacidade tumorigênica das iPSC [212]. Entretanto, a cooperação mútua entre c-MYC e KLF4 é essencial para uma reprogramação bem sucedida, em que a presença de ambos leva ao equilíbrio necessário para a manutenção da pluripotência, apesar de atuarem em vias opostas [209]. c-MYC aumenta os níveis de proliferação, sendo benéfico para o sucesso da reprogramação, porém, sua alta expressão resulta no aumento de p53; enquanto que KLF4 aumenta os níveis de p21, que resulta na redução da proliferação, além de reduzir p53, que diminui os níveis de apoptose [209].

As iPSC possuem uma promissora utilização terapêutica, por apresentarem características semelhantes as células embrionárias, com índices proliferativos altos, além de serem capazes de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários. Contudo, o principal teste que classifica uma iPSC totalmente reprogramada é o ensaio *in vivo* utilizando camundongos *nude* para verificar se essas células são capazes de formar teratomas, demonstrando que são competentes para produzir qualquer tipo celular [32]. Assim, existe um paradoxo referente as iPSC, pois ao mesmo tempo que são promissoras no uso em diversas terapias, elas apresentam capacidade tumorigênica que dificultaria o uso clínico [32,213].

HIPÓTESE

iPSC representam uma fonte de células com amplo potencial terapêutico. Entretanto, o risco de formação de teratomas restringe o seu uso clínico e esse risco diminui com a diferenciação das células pluripotente presentes. Assim, a presença dos genes utilizados para a reprogramação são os responsáveis pela presença dos teratomas após o transplante das iPSC.

OBJETIVO

Avaliar a associação dos genes marcadores da pluripotência (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC e NANOG) na formação de teratomas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Silenciar genes importantes para manter o estado pluripotente via shRNA
2. Avaliar o potencial de formação de teratomas das células silenciadas
3. Analisar a resposta das células silenciadas ao tratamento com cisplatina e etoposídeo *in vitro*

CAPÍTULOS

Os resultados obtidos durante o doutorado foram agrupados em três capítulos, sendo que cada um representa um artigo, o primeiro publicado e os outros dois a serem submetidos.

O primeiro capítulo engloba o artigo intitulado “*Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis*” publicado em 2016 na revista *Cancer Treatment Reviews*. Nesse artigo participei de toda a preparação do artigo, desde a sugestão do tema e organização do artigo até a revisão da literatura e rascunho do manuscrito, além de realizar os alinhamentos.

O segundo capítulo constitui-se do artigo intitulado “*Silencing of the transcription factors Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc or Nanog has different effect on teratoma growth.*” a ser submetido à *Cellular Oncology* no formato de *Research Article*. Minha participação consistiu na realização dos experimentos e na escrita do manuscrito.

O terceiro capítulo constitui-se do artigo intitulado “*Importance of Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc or Nanog expression in the treatment response using cisplatin and etoposide in P19 teratocarcinoma cells.*” a ser submetido à *Cancer Medicine* no formato de *Research Article*. Minha participação consistiu na realização dos experimentos e na escrita do manuscrito.

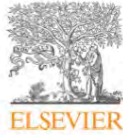
Assim, a discussão será realizada com base nessas informações.

CAPÍTULO I

“Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis”

Status: publicado, 2016.

Revista: Cancer Treatment Reviews.



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Treatment Reviews

journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/ctrv

Tumour Review

Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis

Emily Schlee Villodre^a, Franciele Cristina Kipper^a, Mariana Brutschin Pereira^a, Guido Lenz^{a,b,*}^a Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501970, Brazil^b Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 August 2016

Received in revised form 4 October 2016

Accepted 7 October 2016

Keywords:

OCT4

POU5F1

Cancer biomarker

Prognosis

Chemoresistance

Cancer stem cell

ABSTRACT

OCT4 (POU5F1) is a major regulator of cell pluripotency and plays an important role not only during embryogenesis but also in tumorigenesis. It has been studied in various types of cancers, since stemness is an important factor for cancer growth and therapy. Here we present basic information about the OCT4 gene, its isoforms and pseudogenes besides discussing the current literature in which OCT4 is linked to cancer, emphasizing its roles in tumorigenesis and therapy. The majority of studies indicated a negative correlation between the expression of OCT4 and prognosis, and only in testicular germ cell tumor this correlation was positive. Using The Cancer Genome Atlas database we showed that OCT4 expression correlated negatively with patient survival in pancreatic cancer. All those different impacts of OCT4 on cancer indicate the biological complexity of this transcription factor in biology and, therefore, also in cancer.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Cancer is one of the major causes of mortality in the world. Traditional and novel therapies (surgical resection, chemotherapy, radiotherapy, antibody and hormonal therapies) have been used to reduce mortality. However, despite the fact that cancer mortality rates are declining, there are still many patients in which cancer recurs after treatment and the therapy-resistant tumors usually possess a higher proportion of cells with stemness features when compared to the tumor prior to treatment [1,2].

In cell biology, a stem cell can renew itself and differentiate into cell types with defined characteristics that are able to perform physiologic functions. Although dedifferentiation is possible under very specific conditions, the process normally goes from

stem cell to differentiated cell. In contrast, cancer cells do not perform a physiological function and, therefore, the definition of a differentiated cancer cells relies only on limited morphological features or the expression of some markers shared with normal differentiated cells. Similarly, cancer stem cells (CSCs) are cells that share certain markers with normal stem cells and can give rise to differentiated cancer cells. The direction from stem to differentiated cells seems much less conserved in cancer biology than in physiology, as differentiated cancer cells can give rise to CSCs and vice versa [3,4]. In the present review, we will refer to cancer stem cells (CSCs) and differentiated cancer cells bearing in mind the fundamental differences stated above with normal stem cells and differentiated cells.

OCT4 is an important transcription factor (TF) during embryogenesis and it is essential to generate induced pluripotent cells (iPS) [5,6]. Additionally, a fine tuned regulation of its levels is fundamental for the maintenance of the pluripotency, since either high or low expression may induce differentiation [6,7].

The present review describes the current knowledge of the role of OCT4 in the control of the differentiation, its use as a CSCs marker and the impact of isoforms and pseudogenes in OCT4 analysis. The correlation of OCT4 expression with patient's prognosis in a variety of cancer types is also discussed, as well as its importance in chemoresistance.

Abbreviations: CSCs, cancer stem cells; DNA, deoxyribonucleic acid; ECCs, embryonal carcinoma cells; ESCs, embryonic stem cells; ESCC, esophageal squamous cell carcinoma; GC, gastric cancer; HCC, hepatocellular carcinoma; HIFs, hypoxia-inducible factors; HSCC, hypopharyngeal squamous cell carcinoma; hMSCs, human mesenchymal stem cells; iPS, induced pluripotent cells; lncRNA, long non-coding RNA; miRNA, microRNA; OCT4, octamer 4 or POU5F1; OCT4-pg, OCT4 pseudogene; OSCC, oral squamous cell carcinoma; pMEFs, primary mouse embryonic fibroblasts; RNA, ribonucleic acid; shRNA, short hairpin RNA; TF, transcription factor; TGCT, testicular germ cell tumor.

* Corresponding author at: Av. Bento Gonçalves 9500, Building 43431 Lab 115, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail addresses: emilyvillodre@gmail.com (E.S. Villodre), franciele.kipper@yahoo.com.br (F.C. Kipper), mbrutschin@gmail.com (M.B. Pereira), lenz@ufrgs.br (G. Lenz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.003>
0305-7372/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

OCT4 background

OCT4 (octamer-binding transcription factor 4, also known as POU5F1 and OCT3) is a member of the POU family of TF whose main function is to bind an octameric sequence motif (ATGCAAAT) in order to activate the expression of target genes [8]. The human OCT4 gene is located on chromosome 6 (6p21.31) and can generate three isoforms that share the same POU DNA-binding and C-terminal transactivation domains but differ in the N-terminal region [9] (Fig. 1). OCT4A is the main variant and acts as a TF in pluripotent cells. In contrast, OCT4B can generate three alternative translation products: OCT4B-265, OCT4B-190, and OCT4B-164 and is predominantly localized in the cytoplasm [10]. Nonetheless, the localization of each isoform is still a matter of debate. Wang et al. showed predominant cytoplasmic location of different GFP-tagged isoforms in MCF-7 cells [11]. In contrast, Guo et al. found that OCT4B-265-GFP and OCT4B-164-GFP are localized more in the nucleus while OCT4B-190-GFP was present as dots in the cytoplasm of NIH3T3 cells [12]. OCT4B1 was described later and its endogenous presence was shown in the cytoplasm of RT4 cells [13]. Differently from OCT4B mRNA, OCT4B1 mRNA is characterized by retaining the intron 2 as a cryptic exon with 233 bp, which contains an in frame TGA stop codon [13]. Analysis, by western blot, found that OCT4B1 produced a truncated protein and an oncogenic function for this isoform was described in colon cancer [14,15]. OCT4B1 can also act as a precursor for OCT4B by losing the cryptic exon [14,16].

The question of the specific function of each OCT4 isoform is still unanswered. OCT4A has a high expression in early development (zygote, morula, inner cell mass of blastocysts) and cells with stem cell properties such as embryonic stem cells (ESCs), embryonic carcinoma cells (ECCs), CSCs, germ cells, and germ tumors cells [14]. Therefore, OCT4A is key to stemness properties and central for generating iPS [5,11,13]. On the other hand, OCT4B and OCT4B1 are more related with stress response than with sustaining self-renewal of ESCs, since OCT4B1 increases after heat stress. Likewise, OCT4B-190 levels raise after heat and oxidative stress, where it plays a protective action against cell stress by preventing apoptosis and forming aggregates in the cytoplasm known as SGs (stress granules) in response to stress [11,14]. OCT4B-265 levels increase after genotoxic stress and it promotes p53-dependent cell apoptosis in ESCs and ECCs cells [11,17]. Additionally, a new function for OCT4B was described recently, wherein it can act as an OCT4A regulator in a miRNA-dependent manner at the post-

transcription level through competing endogenous RNA (ceRNA) regulation [18].

Different levels of OCT4 can induce different cell fates

OCT4 is expressed during the early stages of development, being downregulated during differentiation of the cells that form the trophoblast, but retain high expression in the inner cell mass of the blastocyst. Later, during development, differentiation of embryonic ectoderm into different tissues depends on a rapid decrease in OCT4 expression [19–21].

Interestingly, the amount of OCT4 is important to define ESCs fate determination, since there are three possible destinies for these cells: (1) maintenance of the self-renewal capacity/stem cell phenotype by keeping OCT4 expression in an intermediary level (2) differentiation into trophoctoderm lineage when OCT4 levels decrease; and (3) differentiation into primitive endoderm or mesoderm when OCT4 levels increase [6]. This dependency on dose seems also to affect the oncogenic potential of OCT4 in ESCs – high levels of OCT4 increase the malignant potential with a more primitive and aggressive tumor phenotype, whereas low OCT4 expression lead to a regression of the malignant phenotype, with a more differentiated morphology [7].

OCT4 is not the only important factor to maintain the pluripotency or to induce differentiation in ESCs. In fact, it forms a complex with other TFs, such as SOX2 and NANOG, in order to regulate the expression of several genes [22]. OCT4 and SOX2 along with NANOG work cooperatively in an interdependent transcriptional net to stimulate transcription not only of their own genes, but also the expression of other key genes required for embryogenesis, including FGF4 and Zfp42/Rex1 [22,23]. In addition, they share many target genes, therefore, activating and maintaining the expression of genes involved in self-renewal, while simultaneously repressing genes that mediate differentiation [22]. Moreover, KLF4 is able to interact directly with both OCT4 and SOX2, through the zinc finger structure at its C-terminal part, and is also required to activate transcription of NANOG [24].

The importance of this interaction is also observed when the survival of patients is analyzed. For example, high expression of OCT4 and NANOG was associated with pancreatic carcinogenesis, and, silencing both of those genes resulted in decreased proliferation, migration, invasion, chemoresistance and tumorigenesis in pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo* [23,24]. Decreased expression

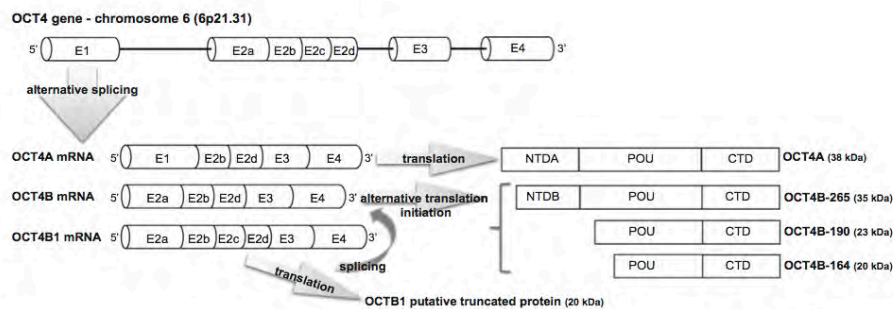


Fig. 1. Scheme of human OCT4 gene, mRNAs and proteins. The OCT4 gene can generate three mRNA isoforms by alternative splicing, OCT4A, OCT4B and OCT4B1. OCT4A is translated in only one protein, whereas OCT4B can, by alternative translation initiation, generate three protein isoforms: OCT4B-265, OCT4B-190 and OCT4B-164. OCT4B1 mRNA translates into a truncate protein but it can also be spliced and generate OCT4B. Abbreviations: CTD, carboxi-terminal domain; NTD, amino-terminal domain; POU: POU homeodomain. Adapted from Gao et al. (2012) [17].

of SOX2, KLF4 and Brachyury was associated with survival and metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma [27].

OCT4 pseudogenes and its functions

Pseudogenes can have a variety of functions through their RNA. It has become well established that pseudogene-derived RNAs can act as regulators of the expression of their homologous functional gene, through mechanisms that include miRNAs sponge, ceRNAs or short interfering RNA [28–30].

Six pseudogenes for OCT4 were identified in ESCs (OCT4-pg1–pg6) with a high degree of sequence conservation to the parental gene [31,32]. Surprisingly, four of the six pseudogenes were recently described as able to be translated (Table 1). OCT4-pg1, pg3, pg4 and pg5 encode proteins that are highly homologous to OCT4A, while OCT4-pg2 and pg6 are apparently not able to produce proteins [33]. Nucleotide Blast alignment (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) was used to show the high identity of the mRNA of these pseudogenes not only with OCT4A (Fig. 2A), but also with OCT4B (Fig. 2B) and OCT4B1 (Fig. 2C) (Supplementary data). Direct comparison of promoter region, 5'UTR, Coding Sequence (CDS) and 3'UTR of OCT4A and OCT4-pg1 indicates high identity in all elements, despite differences in size (Fig. 2D).

Analysis in primary leukemia samples and others somatic cancer showed that OCT4 pseudogenes transcripts are expressed [34]. OCT4-pg4 was expressed together with OCT4 in hepatocellular cancer cells and OCT4-pg1, pg3 and pg4 were expressed in human glioma and breast carcinoma tissues or cell lines, whereas they were not present in seminoma or NTERA-2 cells [9,28]. The expression of these pseudogenes was also observed in somatic tumor cell lines and adult stem cells, except in human ESCs and germ cell tumor-derived cell lines [35]. OCT4-pg1 and pg5 were observed in many cancer cell lines and tissues samples but not in ECCs, human fibroblasts, and normal tissues (striped muscle and skin) [32].

To better understand the relation between the expression of OCT4 and their pseudogenes, we performed a correlation analysis of OCT4 and OCT4-pg1 expression levels. However it is worth to emphasize that we were not able to separate the data of the different isoforms. Analysis of RNA-seq databases provided by TCGA for pancreas, liver, breast and stomach cancer showed a positive correlation of the expression levels of these genes in pancreas (Fig. 2E) and liver (Fig. 2F) tumors, but not in breast and stomach cancers (data not shown). This suggests that the high similarity between these genes maintained aspects of their transcriptional and stability regulation and is supportive of a role as miRNA sponge of OCT4 in these cancers [36].

Regarding possible functions for OCT4 pseudogenes, recent data suggest that they can act as regulators of OCT4. OCT4-pg4 and pg5 function as a miRNA sponge protecting OCT4 transcript from inhibition by miR-145 in hepatocellular carcinoma cells (HCC) and endometrial carcinoma, respectively [29,37]. During mouse ESCs differentiation, OCT4-pg4 long non-coding RNA (lncRNA) seems

to induce and maintain OCT4 gene silenced and OCT4-pg4 was repressed during the conversion of primary mouse embryonic fibroblasts (pMEFs) into iPS [29]. In addition to function as regulators, OCT4-pg4 was linked to promoting growth and tumorigenicity in HCC cells, and high levels of this pseudogene correlated with poor prognosis in HCC patients [28].

OCT4 and cancer

Chemotherapy resistance and tumor differentiation

Tumors are characterized by their heterogeneity concerning the presence of cells expressing stem cell markers. More importantly, this heterogeneity seem to be unstable, i.e. cancer cells are able to toggle between less and more differentiated states [3,4]. This dynamic nature of phenotypes is also present in others processes, such as EMT and MET, which we discussed recently in this review [38].

Resistance to therapy occurs in a small proportion of cells and they were, in several types of cancers, identified as CSCs cells [39–43] (reviewed by Dean et al. [43]). Moreover, enrichment of cells with CSCs characteristics was observed after therapy. For example, gamma radiation increased the proportion of CD133⁺ cells in glioblastoma [44]; and, in lung cancer cells, treatment with cisplatin, etoposide, doxorubicin, paclitaxel gamma radiation increased the levels of OCT4, and CD133 positive cells were more resistant to these treatments when compared to CD133 negative cells [45]. Additionally, the origin of these therapy-resistant cells is still contradictory, wherein they can arise from mutations in stem/progenitors cells or from differentiated cells that reprogram themselves to a more undifferentiated state [43,46,47]. Thus, long-term *in vivo* studies where stemness is analyzed and/or targeted can help to uncover the selection of a resistant subpopulation with CSC features [40]. Therefore, therapy targeting this specific population is a long-sought-after strategy that has not yet provided breakthrough results (reviewed elsewhere by Han et al. [40]).

OCT4 has been one of many genes used as marker of CSCs, however it cannot be used alone without considering other genes in this complex phenotype, such as CD133, SOX2, NANOG, ALDH [48–51]. Nowadays, to confirm the presence of CSCs in a cancer or cell culture, three or more markers are usually employed, with at least one being specific for the given type of cancer. In ovarian cancer the co-expression of CD44, C-erbB1, c-Met, NANOG, and OCT4 is used in order to enrich undifferentiated cells and combination of CD44, OCT4 and other markers are used for the isolation of undifferentiated prostate cells, which present high tumor initiating capacity [52]. One example of undifferentiated markers with prognostic value is the expression of OCT4, SOX2, GLI1, CD44, CD133 (together with p-AKT and p-ERK), which correlate with a more aggressive phenotype in gastric cancer and poor overall prognosis of patients [53].

Table 1
Pseudogenes features (NCBI access feb/2016).

Name	Aliases	Gene ID	Location	mRNA ID	Status	mRNA size
OCT4-pg1	POU5F1B; POU5F1P1	5462	Chr 8	NM_001159542.1	Validated	1599 bp
OCT4-pg2	POU5F1P2	100129512	Chr 8	ND	Inferred	ND
OCT4-pg3	POU5F1P3; POU5F1L	642559	Chr 12	NR_036440.1	Validated	1084 bp
OCT4-pg4	POU5F1P4; POU5FLC1	645682	Chr 1	NR_034180.1	Validated	1083 bp
OCT4-pg5	POU5F1P5	100009667	Chr 3	NR_131184.1	Validated	937 bp
OCT4-pg6	POU5F1P6	100009668	Chr 3	ND	Inferred	ND

ND, Not determined; Chr, chromosome; bp, base pair; pg, pseudogene.

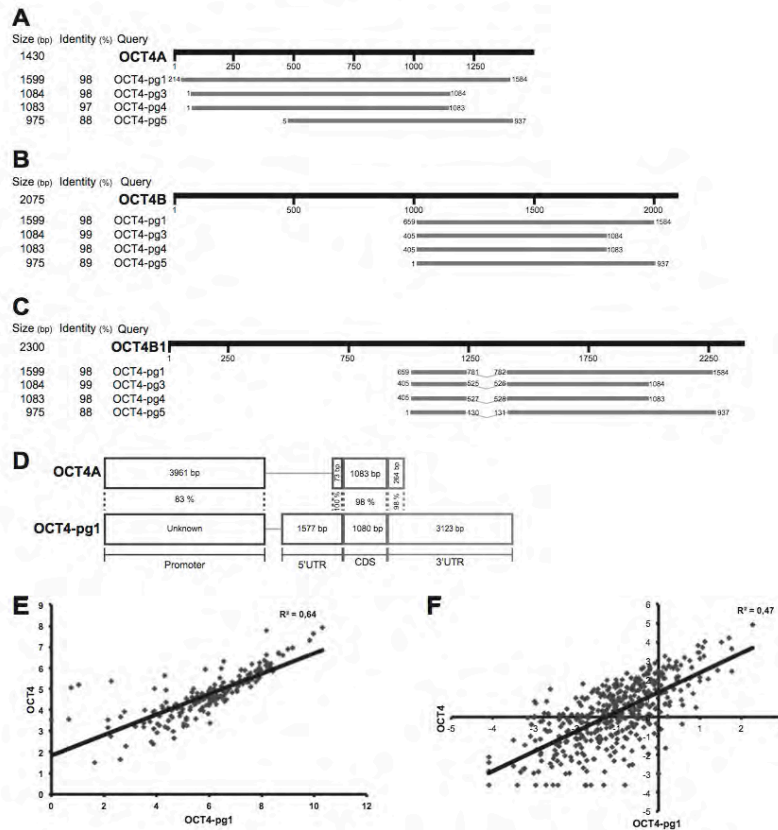


Fig. 2. OCT4 pseudogenes. (A–C) Pseudogenes 1, 3–5 were aligned with gene mRNA transcripts using nucleotide Blast alignment. mRNA sequence alignments with OCT4A (NM_002701.5) (A), OCT4B (NM_001285987.1) (B), and OCT4B1 (NM_001285986.1) (C) mRNA are shown. The mRNA size and the degree of homology are on the side of each alignment. (D) OCT4A and OCT4-pg1 promoter, 5'UTR, CDS and 3'UTR were aligned using NCBI Blast and the percentage of identity is shown between the two alignments. (E–F) Correlation analysis between the expression levels of OCT4A and OCT4-pg1 in pancreas (E), and liver (F) cancers. Abbreviations: bp, base pair; CDS, coding sequence; pg, pseudogene; UTR, untranslated region.

OCT4 and therapy

In cancer cells, particularly in CSCs, OCT4 seems to play distinct functions or act in different pathways as the ones observed in normal ESCs. In chemoresistant HeLa and PLC cells, OCT4 levels increased in relation to sensitive cells through demethylation of its promoter [41]. In CWR-R1, a prostate cancer cell line, OCT4 expression was high in both docetaxel and mitoxantrone-resistant lines [54]. Additionally, radiation-resistant cervical carcinoma and chemoresistant oral squamous carcinoma cancer patients presented higher levels of OCT4 than sensitive cancers [55,56] (Table 2 and Supplementary Table).

Overexpression of OCT4 can be used to understand its role in chemoresistance to multiple drugs. For example, transfection of OCT4 increased resistance to cisplatin in cervical cancer [18]. The same was observed in PLC cells with OCT4 transiently overexpressed and treated with cisplatin and doxorubicin but in MIHA, a normal hepatic cell line, there was no alteration in cell viability

[41]. Also, OCT4 induced activation of TCL1, AKT, and ABCG2 in the process of inducing chemoresistance, suggesting a new potential pathway [41] (Table 2 and Supplementary Table). In another HCC cell line, MHCC97-L, OCT4 plus NANOG overexpression also lead to resistance to cisplatin and, when melanoma cells overexpress OCT4, they grew faster and were more resistant to hypoxia and cisplatin treatment than control cells, again, pointing to an involvement of OCT4 in chemoresistance mechanisms [49,57].

OCT4-knockdown (OCT4 KD), on the other hand, increases the sensitivity to cisplatin and irradiation in lung and ovarian cancer and increases sensitivity to temozolomide in glioma-initiating cells *in vitro* [45,58–60].

Testicular germ cell tumor (TGCT) is an exception to the chemoresistance role of OCT4, since exposure to cisplatin reduced its expression and increased resistance (Table 3) [61–63]. The possible mechanisms for how chemotherapy acts in the modulation of OCT4 is still unclear, as only one study, in TGCT cells, observed that the cisplatin reduced expression of OCT4 through sumoylation

Table 2

OCT4 expression compared with patients' outcome in different type of cancers. Numbers mark the reference in which the indicated correlation was found and bold indicates positive, underlined no predominance and regular negative correlation.

Tumor Type	High Expression Worse Outcome	High Expression Better Outcome	Undefined	OCT4 analysis type		
				RNA	Protein	
Mixed origin	Testicular germ cell tumor (TGCT)/ embryonal carcinoma (EC)	7	61^{1(cc)}, 62^{1(cc)}, 63	77	62, 63	7, 61, 62, 63, 77
Non epithelial origin	Acute myeloid leukemia	78	-	-	78	-
Epithelial origin	Melanoma	57 ^(cc) , 79 ^(cc)	-	-	57,79	57
	Glioma	60, 80, 81, 82	-	-	80, 81, 82	60, 80, 81, 82
	Neuroblastoma	83	84 ^(cs)	-	83, 84	83,84
	Medulloblastoma	85	-	-	85	-
	Oral squamous cell carcinoma (OSCC)	56 ^(cr) , 65, 67 ² , 86, 87	66	-	56, 65, 67	56, 65, 66, 67, 86, 87
	Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC)	88, 89, 90	-	-	88, 89, 90	88, 89, 90
	Hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC)	-	91	-	-	91
	Breast cancer	73, 74, 75	76, 92 ²	-	73, 74, 76	73, 74, 75, 76, 92
	Lung adenocarcinoma	45 ^(kd) , 58 ^(kd cc) , 75 ^(kd cc) , 93, 94	-	95 ^(cc)	45, 58, 94, 95	45, 75, 93, 94, 95
	Hepatocellular carcinoma (HCC)	28, 33, 41 ^(cr) , 49 ^(cc) , 96, 97, 98, 99, 100	-	-	28, 33, 41, 49, 96, 97, 99, 100	28, 33, 41, 49, 96, 97, 98, 99, 100
	Gastric cancer	69	70	68 ³	68, 69	68, 69, 70
	Pancreatic carcinoma	26, 71 ^(cc) , 72 ⁵	25 ⁶	-	26, 71, 72	25, 26, 71, 72
	Cervical carcinoma	18 ^(cc) , 92, 101	-	102	18, 102	18, 92, 101, 102
	Ovarian cancer	59, 103, 104, 105	-	-	59, 103, 104	59, 103, 104, 105
	Prostate cancer	54 ^(cc) , 106	-	-	54	54, 106
Bladder carcinoma	107 ⁸ , 108, 109, 110, 111	-	-	107, 108, 109, 110	107, 108, 109, 110, 111	
Rectal cancer	112	-	-	112	112	

Abbreviations: cc, cell culture; cr, chemoresistant; cs, chemosensitive with OCT4 expression; kd, knockdown.

¹ Lack of expression resulted in increased resistance.

² Increased levels in recurrent tumors.

³ Less metastasis.

⁴ Higher expression than normal and correlated w/differentiation.

⁵ Associated w/differentiation degree.

⁶ Strong expression in pre-cancerous condition.

⁷ Higher proliferation.

⁸ Higher expression than normal.

Table 3

Alteration in OCT4 expression after drug treatment *in vitro*.

Tumor type	Dosage	Treatment time	OCT4 expression	OCT4 analysis type		Possible mechanism	Reference
				RNA	Protein		
TGCT	Cisplatin 3 μM	24 h	Decreased	X	X	-	[61]
	Cisplatin 5–50 μM or Bleomycin 1–10 μM	Not mentioned	Decreased	X	X	OCT4 sumoylation	[62]
	Cisplatin 0.25, 0.5 and 1 μM	48 h	Decreased	X	X	Cisplatin induced differentiation markers	[63]
Melanoma	Cisplatin 1, 10, 25 and 100 μM	24 h	Increased	X	X	-	[57]
Neuroblastoma	Retinoic acid	12 to 72 h	Increased	X	X	-	[83]
Rectal	IR 5 Gy	Not mentioned	Increased	X	X	-	[112]

[62]. In contrast, oral cancer, similar to other types of tumor (Table 3), therapy-resistant cells presented high levels of OCT4 [56].

OCT4: the good or the bad?

Tumors can be classified according to their differentiation state (epithelial, nonepithelial or mixed), embryonic origin (endoderm, mesoderm or ectoderm) and biological behavior (benign or malignant) [64]. The majority of the studies comparing OCT4 expression in cell lines and/or clinical prognosis used tumors with epithelial origin as model (Table 2; Supplementary Table). In 15 out of 19

tumor types, high expression of OCT4 correlated with worse prognosis in patients, *i.e.*, more aggressive tumors, short overall survival or chemoresistance. In hypopharyngeal squamous cell carcinoma (HSCC) and TGCT high expression of OCT4 correlated with better prognosis in patients, *i.e.*, higher overall survival (Table 2, bold). In the remaining cancer types, the number of studies that indicate positive or negative impact of OCT4 expression on patient survival is similar (Table 2, underlined). Epithelial or not epithelial origin does not seem to be determinant to define the role of OCT4 on patient's prognosis.

TGCT can be divided in two major groups: seminomatous and non-seminomatous, with the former being characterized for

having more primitive germ cells and the latter containing mainly ECCs and usually occurring as mixed tumors presenting undifferentiated and differentiated aspects [63]. TGCT, differently of most solid tumors, are normally sensitive to chemotherapy, especially to cisplatin. However, resistance develops in some cases, probably associated with the emergence of more differentiated teratomatous elements [63]. After analysis of different subtypes of TGCT, it was found that the levels of OCT4 increased with the malignancy of these tumors [7]. Nonetheless, two recent studies observed that low levels correlated with cisplatin resistance in ECCs [61,62]. Thus, chemotherapy-induced reduction in OCT4 expression or selection of cells with low expression seems to be linked to worse outcome, differently from what was observed in other solid tumors.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the sixth most prevalent malignancy worldwide and more than 50% of patients die of this disease or complications within 5 years under current therapies [65,66]. In five out of six studies with patients, high levels of OCT4 correlated with lower overall survival (Table 2 and Supplementary Table). Additionally, an increased tumorigenicity was observed when OCT4 was overexpressed in two cell lines. On the other hand, stable silencing lead to a tumor volume reduction and abolishment of the stemness characteristics [65,67]. It was also observed that samples derived from metastatic tissues and recurrent tumor sample had higher levels of OCT4 compared to tumor region and primary tumor, respectively [67]. Only Fu et al. observed an inverse correlation: cells corresponding to tumor-adjacent normal tissue presented increased expression of OCT4 when compared to tumor tissues [66].

The importance of OCT4 in gastric cancer (GC) is still unclear. One of the first study to analyze this issue found that the expression of OCT4 inversely correlated with the differentiation status of the tumor, wherein more OCT4-positive cells were observed in undifferentiated or poorly differentiated compared to moderately or well differentiated tissues samples [68]. A recent study found that patients with tumors containing high levels of OCT4 presented shorter survival time than the ones with low OCT4 levels [69]. On the other hand, evaluation of 290 GC samples showed that patients with positive expression tended to have a longer overall survival when compared to OCT4-negative cases [70]. Lower expression was also related with worse clinicopathologic features such as more depth of tumor invasion, lymph node metastasis, and lymphatic invasion [70].

Pancreatic carcinoma has one of the poorest survival rates of all cancers. The first study that analyzed OCT4 found higher expression in precancerous lesions than cancer tissue samples [25]. Recent data showed that patients with tumors presenting high OCT4 had worse overall survival [26,71]. Additionally, downregulation of OCT4 suppressed the growth and invasion in Panc-1 cell line [72].

In breast cancer cell line 4T1, OCT4-positive cells were more tumorigenic than OCT4-negative [73]. A positive association of poor overall and disease-free survival with high expression of OCT4 was observed in breast cancer patients [74]. However, there are still problems regarding experiments, not only with OCT4 analysis, but also in cell culture. For example, Hu T. and Hu J. found different results with OCT4 KD using the same cell line, MCF-7. Hu T. observed cell apoptosis *in vitro* and inhibition of tumor growth *in vivo*, while Hu J. showed induction of EMT and enhanced migration and invasion *in vitro* [75,76].

To contribute to the analysis of the impact of OCT4 on cancer patient's survival, we analyzed RNA-seq datasets from different cancer types from the TCGA database. The gene expression and clinical data of pancreas, liver, breast and stomach carcinoma were obtained from <https://genome-cancer.ucsc.edu/> (March, 2016). The impact of OCT4 expression on patient prognosis was evaluated

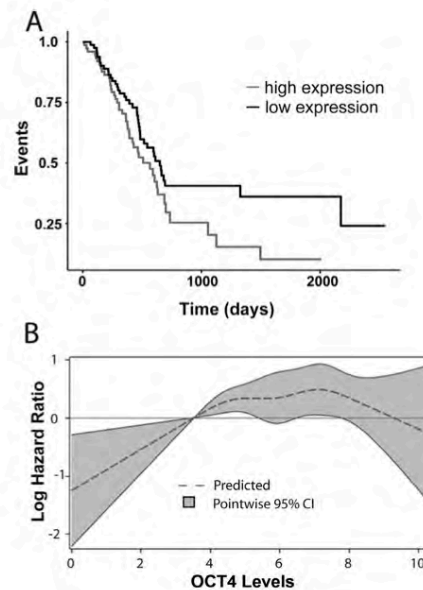


Fig. 3. OCT4 and its prognostic value for pancreatic cancer. (A) Kaplan–Meier overall survival curve in the set of 166 tumors derived from patients with pancreatic cancer that were selected according to the expression level of OCT4. Patients were grouped by low and high expression considering the median expression level of the gene. Patients with lower expression levels showed a significantly better overall survival ($p < 0.05$) compared to those with higher expression levels of OCT4. (B) Cox regression with cubic splines. Log (hazard ratio) and gene expression ratio for OCT4 was performed on pancreatic cancer patients.

using Kaplan–Meier method, dividing the patients with high and low expression. In our analysis, we found that OCT4 gene expression was significant as a prognosis marker only for pancreatic tumor, where high expression correlated with worse prognosis (Fig. 3A). This can be better observed with cubic splines and the Cox proportional hazard model, which shows that low expression reduces the hazard, whereas high expression slightly increases it (Fig. 3B). For the other cancers analyzed, the expression levels did not significantly correlate with the progression of the disease (data not shown). It is important to consider that, in the majority of cases, no information is available to distinguish expression of the different OCT4 isoforms and pseudogenes and including this information in the analysis will probably improve the evaluation of the prognostic value of OCT4 gene family.

Conclusions

There is a rising interest in OCT4, especially with the potential applications of iPS being restricted by the risk of teratomas and the role of OCT4 in CSCs. Moreover, the discovery of new isoforms of OCT4 and, also, the presence of pseudogenes are a challenge for defining the real impact that this gene family has on cancer. Furthermore, the core focus of cancer research has been the pursuit for prognosis and therapy response markers, especially after the enormous efforts of TCGA sequencing. Our current understanding of the functions of OCT4 support its importance in tumorigenesis and as a prognosis marker, wherein its presence correlates with worse prognosis in most cancer types, being TGCT the main excep-

tion, were high expression is a good prognosis and its absence correlates with resistance. Therefore, OCT4 expression analysis is a candidate gene for predicting patients' prognosis, particularly for TGCT, pancreas, lung and liver cancer.

Author contributions

ESV, FCK, MBP and GL contributed in the preparation of the manuscript. ESV suggested the review and organized its main topics. ESV, FCK, MBP and GL reviewed the literature and drafted the manuscript. ESV performed the alignments, with the review of FCK and GL. FCK and MBP performed the Kaplan–Meier analysis. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES/PROBITEC (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa Binacional de Terapia), grant number 004/12. ESV is recipient of CAPES fellowship. FCK, MBP and GL are recipients of CNPq fellowships.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.10.003>.

References

- [1] Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:29.
- [2] Ding B, Liu P, Liu W, Sun P, Wang C. Emerging roles of Krüppel-like factor 4 in cancer and cancer stem cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:3629–33.
- [3] Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* 2010;18:510–23.
- [4] Allison MR, Lin WR, Lim SML, Nicholson LJ. Cancer stem cells: in the line of fire. *Cancer Treat Rev* 2012;38:589–98.
- [5] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–76.
- [6] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000;24:372–6.
- [7] Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 2003;4:361–70.
- [8] Wu G, Schöler HR. Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen (London, England)* 2014;3:7.
- [9] Zhao S, Yuan Q, Hao H, Guo Y, Liu S, Zhang Y, et al. Expression of OCT4 pseudogenes in human tumours: lessons from glioma and breast carcinoma. *J Pathol* 2011;223:672–82.
- [10] Wang X, Dai J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells* 2010;28:885–93.
- [11] Wang X, Zhao Y, Xiao Z, Chen B, Wei Z, Wang B, et al. Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. *Stem Cells* 2009;27:1265–75.
- [12] Guo C, Long, Liu L, Jia Y, Dan, Zhao X, Yang, Zhou Q, Wang L. A novel variant of Oct3/4 gene in mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2012;9:69–76.
- [13] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SAM, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells* 2008;26:3068–74.
- [14] Yazd EF, Rafiee MR, Soleimani M, Tavallaee M, Salmani MK, Mowla SJ. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response. *Cancer Lett* 2011;309:170–5.
- [15] Wen KM, Zhang GH, Li J, Chen ZQ, Cheng YL, Su X, et al. OCT4B1 promotes cell growth, migration and invasion suppressing sensitivity to oxaliplatin in colon cancer. *Oncol Rep* 2015;29:43–52.
- [16] Gao Y, Wang X, Han J, Xiao Z, Chen B, Su G, et al. The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B. *J Genet Genomics* 2010;37:461–5.
- [17] Gao Y, Wei J, Han J, Wang X, Su G, Zhao Y, et al. The novel function of OCT4B Isoform-265 in genotoxic stress. *Stem Cells* 2012;30:665–72.
- [18] Li SW, Wu XL, Dong CL, Xie XY, Wu JF, Zhang X. The differential expression of OCT4 isoforms in cervical carcinoma. *PLoS ONE* 2015;10:1–15.
- [19] Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 1994;166.
- [20] Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Schöler HR. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 1998;71:89–98.
- [21] Schöler HR, Dressler GR, Rohdewohid H, Gruss P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 1990;9:2185–95.
- [22] Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, et al. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev* 2009;18:1093–108.
- [23] Boer B, Kopp J, Mallanna S, Desler M, Chakravarthy H, Wilder PJ, et al. Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes. *Nucleic Acids Res* 2007;35:1773–86.
- [24] Wei Z, Yang Y, Zhang P, Andrianakos R, Hasegawa K, Lyu J, et al. Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells* 2009;27:2969–78.
- [25] Wen J, Park JY, Park KH, Chung HW, Bang S, Park SW, et al. Oct4 and Nanog expression is associated with early stages of pancreatic carcinogenesis. *Pancreas* 2010;39:622–6.
- [26] Lu Y, Zhu H, Shan H, Lu J, Chang X, Li X, et al. Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 2013;340:113–23.
- [27] Yoshihama R, Yamaguchi K, Imajyo I, Mine M, Hiyake N, Akimoto N, et al. Expression levels of SOX2, KLF4 and brachyury transcription factors are associated with metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett* 2015;14:35–46.
- [28] Wang L, Guo ZY, Zhang R, Xin B, Chen R, Zhao J, et al. Pseudogene OCT4-pg4 functions as a natural micro RNA sponge to regulate OCT4 expression by competing for miR-145 in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2013;34:1773–81.
- [29] Scarola M, Comisso E, Pascolo R, Chiaradia R, Maria Marion R, Schneider C, et al. Epigenetic silencing of Oct4 by a complex containing SUV39H1 and Oct4 pseudogene lncRNA. *Nat Commun* 2015;6:7631.
- [30] Groen JN, Capraro D, Morris KV. The emerging role of pseudogene expressed non-coding RNAs in cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;350–5.
- [31] Pain D, Chirn GW, Strassel C, Kemp DM. Multiple retrospseudogenes from pluripotent cell-specific gene expression indicates a potential signature for novel gene identification. *J Biol Chem* 2005;280:6265–8.
- [32] Suo G, Han J, Wang X, Zhang J, Zhao Y, Zhao Y, et al. Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;337:1047–51.
- [33] Xu G, Yang L, Zhang W, Wei X. All the tested human somatic cells express both Oct4A and its pseudogenes but express Oct4A at much lower levels compared with its pseudogenes and human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2015;24:1546–57.
- [34] Guo X, Tang Y. OCT4 pseudogenes present in human leukemia cells. *Clin Exp Med* 2012;12:207–16.
- [35] Jez M, Ambady S, Kashpur O, Grella A, Malcuit C, Vilner L, et al. Expression and differentiation between OCT4A and its pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells. *PLoS ONE* 2014;9.
- [36] Le TD, Zhang J, Liu L, Li J. Computational methods for identifying miRNA sponge interactions. *Brief Bioinform* 2016. bbw042.
- [37] Bai M, Yuan M, Liao H, Chen J, Xie B, Yan D, et al. OCT4 pseudogene 5 upregulates OCT4 expression to promote proliferation by competing with miR-145 in endometrial carcinoma. *Oncol Rep* 2015;33:1745–52.
- [38] Iser IC, Pereira MB, Lenz G, Wink MR. The epithelial-to-mesenchymal transition-like process in glioblastoma: an updated systematic review and in silico investigation. *Med Res Rev* 2016;1–43.
- [39] Abdullah LN, Chow EKH. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin Transl Med* 2013;2:3.
- [40] Han L, Shi S, Gong T, Zhang Z, Sun X. Cancer stem cells: therapeutic implications and perspectives in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2013;3:65–75.
- [41] Wang XQ, Ongkeko WM, Chen L, Yang ZF, Lu P, Chen KK, et al. Octamer 4 (Oct4) mediates chemotherapeutic drug resistance in liver cancer cells through a potential Oct4-AKT-ATP-binding cassette G2 pathway. *Hepatology* 2010;52:528–39.
- [42] Franqui-machin R, Wendlandt EB, Janz S, Tricot G. Cancer stem cells are the cause of drug resistance in multiple myeloma: fact or fiction? *Oncotarget* 2015;6.
- [43] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:275–84.
- [44] Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote chemoresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006;444:756–60.
- [45] Chen YC, Hsu HS, Chen YW, Tsai TH, How CK, Wang CY, et al. Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells. *PLoS ONE* 2008;3:1–14.

- [46] Pisco AO, Huang S. Non-genetic cancer cell plasticity and therapy-induced stemness in tumour relapse: "What does not kill me strengthens me". *Br J Cancer* 2015;112:1725–32.
- [47] Lenz G. Transient oncogenes. *Med Hypotheses* 2010;75:660–2.
- [48] Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 2007;67:4010–5.
- [49] Yin X, Zhang BH, Zheng SS, Gao DM, Qiu SJ, Wu WZ, et al. Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Smad signaling. *J Hematol Oncol* 2015;8:23.
- [50] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396–401.
- [51] Fábán A, Vereb G, Szöllösi J. The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: markers, pathways and therapy. *Cytom Part A* 2013;83:62–71.
- [52] Yi SY, Hao Y, Bin, Nan KJ, Fan TL. Cancer stem cells niche: a target for novel cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev* 2013;39:290–6.
- [53] Zhang X, Hua R, Wang X, Huang M, Gan L, Wu Z, et al. Identification of stem-like cells and clinical significance of candidate stem cell markers in gastric cancer. *Oncotarget* 2016;7:9815–31.
- [54] Linn DE, Yang X, Sun F, Xie Y, Chen H, Jiang R, et al. A role for OCT4 in tumor initiation of drug-resistant prostate cancer cells. *Genes Cancer* 2010;1:908–16.
- [55] Shen L, Huang X, Xie X, Su J, Yuan J, Chen X. High expression of SOX2 and OCT4 indicates radiation resistance and an independent negative prognosis in cervical squamous cell carcinoma. *J Histochem Cytochem* 2014;62:499–509.
- [56] Tsai LL, Yu CC, Chang YC, Yu CH, Chou MY. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011;40:621–8.
- [57] Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimotty PA, et al. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene* 2012;31:4898–911.
- [58] Cortes-Dericks L, Farashahi Yazd E, Mowla SJ, Schmid RA, Karoubi G. Suppression of OCT4B enhances sensitivity of lung adenocarcinoma A549 cells to cisplatin via increased apoptosis. *Anticancer Res* 2013;33:5365–74.
- [59] Samardzija C, Luwor RB, Volchek M, Quinn MA, Findlay JK, Ahmed N. A critical role of Oct4A in mediating metastasis and disease-free survival in a mouse model of ovarian cancer. *Mol Cancer* 2015;14:152.
- [60] Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Saito N, Miyazawa K, et al. Glioma-initiating cells retain their tumorigenicity through integration of the Sox axis and Oct4 protein. *J Biol Chem* 2011;286:41434–41.
- [61] Mueller T, Mueller LP, Luetzkendorf J, Voigt W, Simon H, Schmol H-J. Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance. *Tumour Biol* 2006;27:71–83.
- [62] Wu YC, Ling TY, Lu SH, Kuo HC, Ho HN, Der Yeh S, et al. Chemotherapeutic sensitivity of testicular germ cell tumors under hypoxic conditions is negatively regulated by SENP1-controlled sumoylation of OCT4. *Cancer Res* 2012;72:4963–73.
- [63] Abada PB, Howell SB. Cisplatin induces resistance by triggering differentiation of testicular embryonal carcinoma cells. *PLoS ONE* 2014;9.
- [64] Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 2nd ed. 2013. vol. 53.
- [65] Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:4085–95.
- [66] Fu TY, Hsieh IC, Cheng JT, Tsai MH, Hou YY, Lee JH, et al. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *J Oral Pathol Med* 2015;45:89–95.
- [67] Tsai LL, Hu FW, Lee SS, Yu CH, Yu CC, Chang YC. Oct4 mediates tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas through the regulation of epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* 2014;9:1–8.
- [68] Chen Z, Xu WR, Qian H, Zhu W, Bu XF, Wang S, et al. Oct4, a novel marker for human gastric cancer. *J Surg Oncol* 2009;99:414–9.
- [69] Kong D, Su G, Zha L, Zhang H, Xiang J, Xu W, et al. Coexpression of HMG2 and Oct4 predicts an unfavorable prognosis in human gastric cancer. *Med Oncol* 2014;31:130–40.
- [70] Matsuoka J, Yoshiro M, Sakurai K, Kubo N, Tanaka H, Muguruma K, et al. Role of the stemness factors sox2, Oct3/4, and nanog in gastric carcinoma. *J Surg Res* 2012;174:130–5.
- [71] Gao L, Yang Y, Xu H, Liu R, Li D, Hong H, et al. MiR-335 functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting OCT4. *Tumour Biol* 2014;35:8309–18.
- [72] Lin H, Sun LH, Han W, He TY, Xu XJ, Cheng K, et al. Knockdown of OCT4 suppresses the growth and invasion of pancreatic cancer cells through inhibition of the AKT pathway. *Mol Med Rep* 2014;10:1335–42.
- [73] Kim RJ, Nam JS. OCT4 expression enhances features of cancer stem cells in a mouse model of breast cancer. *Lab Anim Res* 2011;27:147–52.
- [74] Liu T, Sun B, Zhao X, Li Y, Gu Q, Dong X, et al. OCT4 expression and vasculogenic mimicry formation positively correlate with poor prognosis in human breast cancer. *Int J Mol Sci* 2014;15:19634–49.
- [75] Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. *Cancer Res* 2008;68:6533–40.
- [76] Hu J, Qin K, Zhang Y, Gong J, Li N, Lv D, et al. Downregulation of transcription factor Oct4 induces an epithelial-to-mesenchymal transition via enhancement of Ca²⁺ influx in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;411:786–91.
- [77] Jones TD, Ulbricht TM, Eble JN, Cheng L. OCT4: a sensitive and specific biomarker for intratubular germ cell neoplasia of the testis. *Clin Cancer Res* 2004;10:8544–7.
- [78] Yin JY, Tang Q, Zhai LL, Zhou LY, Qian J, Lin J, et al. High expression of OCT4 is frequent and may cause undesirable treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Tumour Biol* 2015;3–8.
- [79] Borrull A, Ghislin S, Deshayes F, Lauriol J, Alcaide-Loridan C, Middendorp S. Nanog and Oct4 overexpression increases motility and transmigration of melanoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:1145–54.
- [80] Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, Bing L, et al. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* 2011;59:763–75.
- [81] Du Z, Jia D, Liu S, Wang F, Li G, Zhang Y, et al. Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. *Glia* 2009;57:724–33.
- [82] Holmberg J, He X, Peredo I, Orrego A, Hesselager G, Ericsson C, et al. Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. *PLoS ONE* 2011;6:1–10.
- [83] Kaneko Y, Suenaga Y, Islam SMR, Matsumoto D, Nakamura Y, Ohira M, et al. Functional interplay between MYCN, NCYM, and OCT4 promotes aggressiveness of human neuroblastomas. *Cancer Sci* 2015;106:840–7.
- [84] Yang S, Zheng J, Ma Y, Zhu H, Xu T, Dong L, et al. Oct4 and Sox2 are overexpressed in human neuroblastoma and inhibited by chemotherapy. *Oncol Rep* 2012;28:186–92.
- [85] Rodini CO, Suzuki DE, Saba-Silva N, Cappellano A, De Souza JES, Cavalheiro S, et al. Expression analysis of stem cell-related genes reveal OCT4 as a predictor of poor clinical outcome in medulloblastoma. *J Neurooncol* 2012;106:71–9.
- [86] Sawant S, Gokulan R, Dongre H, Vaidya M, Chaukar D, Prabhaskar K, et al. Prognostic role of Oct4, CD44 and c-Myc in radio-chemo-resistant oral cancer patients and their tumorigenic potential in immunodeficient mice. *Clin Oral Investig* 2016;20:43–56.
- [87] Ravindran G, Sawant S, Hague A, Kingsley K, Devaraj H. Association of differential β -catenin expression with Oct-4 and Nanog in oral squamous cell carcinoma and their correlation with clinicopathological factors and prognosis. *Head Neck* 2015;37:982–93.
- [88] Zhou X, Huang GR, Hu P. Over-expression of Oct4 in human esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cells* 2011;32:39–45.
- [89] Li C, Yan Y, Ji W, Bao L, Qian H, Chen L, et al. OCT4 positively regulates survivin expression to promote cancer cell proliferation and leads to poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 2012;7:1–10.
- [90] He W, Li K, Wang F, Qin Y-R, Fan QX. Expression of OCT4 in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. *World J Gastroenterol* 2012;18:712–9.
- [91] Ge N, Lin HX, Xiao XS, Guo L, Xu HM, Wang X, et al. Prognostic significance of Oct4 and Sox2 expression in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *J Transl Med* 2010;8:94.
- [92] Shen L, Qin K, Wang D, Zhang Y, Bai N, Yang S, et al. Overexpression of Oct4 suppresses the metastatic potential of breast cancer cells via Rnd1 downregulation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2014;1842:2087–95.
- [93] Zhang X, Han B, Huang J, Zheng B, Geng Q, Aziz F, et al. Prognostic significance of OCT4 expression in adenocarcinoma of the lung. *Jpn J Clin Oncol* 2010;40:961–6.
- [94] Chiou SH, Huang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res* 2010;70:10433–44.
- [95] Karoubi G, Cortes-Dericks L, Guggler M, Galetta D, Spaggiari L, Schmid RA. Atypical expression and distribution of embryonic stem cell marker, OCT4, in human lung adenocarcinoma. *J Surg Oncol* 2010;102:689–98.
- [96] Zhu P, Wang Y, He L, Huang G, Du Y, Zhang G, et al. ZIC2-dependent OCT4 activation drives self-renewal of human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 2015;125:3795–808.
- [97] Dong Z, Zeng Q, Luo H, Zou J, Cao C, Liang J, et al. Increased expression of OCT4 is associated with low differentiation and tumor recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract* 2012;208:527–33.
- [98] Cao L, Li C, Shen S, Yan Y, Ji W, Wang J, et al. OCT4 increases BIRC5 and CCND1 expression and promotes cancer progression in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2013;13:82.
- [99] Yuan F, Zhou W, Zou C, Zhang Z, Hu H, Dai Z, et al. Expression of Oct4 in HCC and modulation to wnt/ β -catenin and TGF- β signal pathways. *Mol Cell Biochem* 2010;343:155–62.
- [100] Yin X, Li YW, Zhang BH, Ren ZG, Qiu SJ, Yi Y, et al. Coexpression of stemness factors Oct4 and Nanog predict liver resection. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2877–87.
- [101] Wang YD, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death Dis* 2013;4:e760.
- [102] Liu D, Zhou P, Zhang L, Wu G, Zheng Y, He F. Differential expression of Oct4 in HPV-positive and HPV-negative cervical cancer cells is not regulated by DNA methyltransferase 3A. *Tumour Biol* 2011;32:941–50.
- [103] Peng S, Maihle NJ, Huang Y. Pluripotency factors Lin28 and Oct4 identify a sub-population of stem cell-like cells in ovarian cancer. *Oncogene* 2010;29:2153–9.
- [104] Zhang Z, Zhu Y, Lai Y, Wu X, Feng Z, Yu Y, et al. Follicle-stimulating hormone inhibits apoptosis in ovarian cancer cells by regulating the OCT4 stem cell signaling pathway. *Int J Oncol* 2013;43:1194–204.

- [105] Liu L, Zhang J, Fang C, Zhang Z, Feng Y, Xi X. OCT4 mediates FSH-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion through the ERK1/2 signaling pathway in epithelial ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;461:525–32.
- [106] Wang Q, Zhang JG, Wang W. Expression and significance of S100P, CD147, and OCT4 in different prostate cancer tissue TNM stages. *Genet Mol Res* 2015;14:6844–51.
- [107] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SAM, Bahrami A-RR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1598–602.
- [108] Wu CL, Shieh GS, Chang CC, Te YoY, Su CH, Chang MY, et al. Tumor-selective replication of an oncolytic adenovirus carrying Oct-3/4 response elements in murine metastatic bladder cancer models. *Clin Cancer Res* 2008;14:1228–38.
- [109] Chang CC, Shieh GS, Wu P, Lin CC, Shiau AL, Wu CL. Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:6281–91.
- [110] Hatefi N, Nouraei N, Parvin M, Ziaee SAM, Mowla SJ. Evaluating the expression of Oct4 as a prognostic tumor marker in bladder cancer. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15:1154–61.
- [111] Józwicki W, Brozyna AA, Siekiera J. Expression of OCT4A: the first step to the next stage of urothelial bladder cancer progression. *Int J Mol Sci* 2014;15:16069–82.
- [112] Saigusa S, Tanaka K, Toiyama Y, Yokoe T, Okugawa Y, Ioue Y, et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2009;16:3488–98.

CAPÍTULO II

“Silencing of the transcription factors Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc or Nanog has different effect on teratoma growth.”

Status: a ser submetido.

Revista: Cellular Oncology.

Silencing of the transcription factors Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc or Nanog has different effect on teratoma growth.

Emilly Schlee Villodre¹, Karina Bettega Felipe^{1,2}, Mayumi Zanotta Oyama¹, Francine Hehn de Oliveira³, Patrícia Luciana da Costa Lopez⁴, Claudia Solari⁵, Gustavo Sevlever⁶, Alejandra Guberman⁵ and Guido Lenz^{1,7*}

¹ Laboratory of Cellular Plasticity and Signaling, Department of Biophysics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Department of Clinical Analysis, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

³ Department of Pathology, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵ Laboratory of Stem Cell Gene Regulation, Department of Biological Chemistry, Faculty of Natural Sciences, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

⁶ Applied Neurosciences Research Laboratory (LIAN)-CONICET, Foundation for Fighting Against Childhood Neurological Diseases (FLENI), Buenos Aires, Argentina.

⁷ Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

*** Correspondence to:** Guido Lenz

Departamento de Biofísica, Instituto de Biosciências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43431 Lab 115, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +55 51 33087620; fax: +55 51 33087613

E-mail: lenz@ufrgs.br

Abstract

Induced pluripotent cells (iPSC) have a great potential, but its use is dependent to find strategies to abolish their tumorigenic potential. The use of Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc and Nanog to induce iPSC demonstrated the already known importance of these genes to maintain stemness. Therefore, the presence of these genes is the responsible for iPSC-derived teratomas. P19 teratocarcinoma cell line is used as an iPSC model, since presents embryonic carcinoma cells and has the ability to differentiate into cells of the three embryonic germ layers. Teratocarcinomas are a type of testicular germ cell tumors, not only one of the most common malignancies but also curable. We separately knocked down (KD) the transcription factors used to induce iPSC in P19 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc and Nanog) to check their association with teratoma formation. All KD cells were able to form tumors, but only reduction of Oct4 was able to generate a more differentiated one, presenting cells derived from the three embryonic germ layers. Our results suggest that these transcription factors alone are not able to avoid the formation of teratomas.

Keywords teratocarcinoma, embryonic stem cell, yamanaka factors, knockdown, P19 cell line

1. Introduction

Teratomas are a type of non-seminoma testicular germ cell tumors with benign features. Their main characteristic is the presence of cells derived from the three embryonic germ layers (ectoderm, mesoderm and endoderm) arranged in a random way. Teratomas can be classified in (i) mature, in which presents only differentiated cells; (ii) immature, consisted of immature cells, mainly neuroepithelial components, and may or may not have some mature cells; and (iii) teratocarcinoma, the malignant type of teratomas composed of a mixture of embryonic carcinoma cells and teratomas. An important feature of teratocarcinoma is the presence of embryonic carcinoma cells, which are the malignant counterpart of embryonic stem cells (ESCs) [1–4].

From the start, the reprogrammed nature of induced pluripotent cells (iPSC), formed through the expression of Yamanaka Factors (YFs - Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc) [5] or by replacing Klf4 and c-Myc for Nanog and Lin28, presented a promising substitution of ESCs in several potential clinical applications [6]. Although proving stemness, this feature also indicated that the use of these cells would include a risk of teratoma formation [7, 8]. This risk decreases with the use of cells in a more differentiated state, but the presence of a small fraction of undifferentiated cells could still lead to teratoma formation [9]. Therefore, here we tested whether the genes used for reprogramming are required for teratoma formation and growth.

For this, we silenced YFs and Nanog in P19 cells and measured their teratoma formation capacity. The mouse P19 cell line derives of a teratocarcinoma formed after the implantation of a 7.5 days embryo in the testis of an adult mouse C3WHe [10]. They present a normal karyotype and can be transfected with recombinant DNA generating stable lineages. They are also pluripotent and can differentiate into cells derived from the three embryonic germ layers thus making this cell line a suitable *in vitro* model to study the initial development of mammals, and the mechanisms involved in teratoma formation and maintenance [11, 12].

2. Materials and Methods

2.1 Cell Culture

Mouse teratocarcinoma P19 cells (ATCC[®] CRL1825[™]) obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) low glucose, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 g/mL) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS). Cells were maintained in a 5 % CO₂ humidified incubator at 37 °C. DMEM, FBS, penicillin, streptomycin and B27 were purchased from Gibco (BRL).

2.2 Teratoma Formation

1 x 10⁶ P19 wild type and knocked-down cells were subcutaneously injected into the flank of 6 to 8-week-old male or female Balb/C nude mice, 4 animals for each group. Tumors were measured twice a week with a caliper and volume was estimated by the formula: (length X width²)/2. The animal welfare guidelines for the care and use of laboratory animals were approved by the Ethics Committee and Animal Research of University Hospital Research Center (HCPA - No. 150109).

2.3 Histology and immunohistochemical staining

All mice were anesthetized and killed by overdose with anesthetic after tumours achieved a volume of approximately 1600 mm³. Teratomas were sampled and fixed with 10 % paraformaldehyde for 48 h. Then, samples were embodied in paraffin. 4 μM paraffin-embodied sections were prepared. Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or immune stained using antibody against TRA-1-60 (Santa Cruz), pluripotent marker; beta-III-tubulin (ABCam), ectoderm marker; Brachyury (Santa Cruz), mesoderm marker; and AFP (Pierce), endoderm marker.

3. Results

3.1 Impact of Yamanaka factors and Nanog knockdown on teratoma formation and differentiation

Histological analysis of tumors formed from P19 cells grown subcutaneously in the flank of Balb/C nude mice (Supplementary Fig. S1) with hematoxylin and eosin (H&E) showed that control cells – wild type (Wt) and knockdown control (Ctl KD) – presented high levels of necrosis and neuroepithelial components, mainly formed by neuroectodermal rosettes, characteristic of an immature teratoma (Fig. 1a and b). Only one Wt animal showed the presence of undifferentiated cells and endoderm (Table 1). Ctl KD cells also formed tumors containing undifferentiated cell populations (Fig. 1b) and on tumor contained tissue with endoderm characteristics (Table 1). Immunohistochemistry (IHC) with TRA-1-60 (undifferentiation) and brachyury (primitive mesoderm) were positive in some but not all samples analyzed (Table 2). beta-III-tubulin (ectoderm) stained positive in all samples (Fig. 2a and b).

Table 1 Teratoma differentiation status by hematoxylin & eosin analysis.

	Necrosis	Undifferentiated	Ectoderm	Mesoderm	Endoderm
Wt	3/4	1/4	4/4	0/4	1/4
Ctl KD	4/4	3/4	4/4	0/4	1/4
Oct4#2a KD	0/4	3/4	4/4	2/4	4/4
Oct4#1 KD	3/4	4/4	2/4	0/4	0/4
Oct4#2b KD	3/4	3/4	3/4	2/4	3/4
Sox2 KD	4/4	4/4	3/4	2/4	1/4
Klf4 KD	3/4	4/4	3/4	2/4	0/4
c-Myc KD	1/4	2/4	2/4	0/4	3/4
Nanog KD	4/4	4/4	4/4	0/4	0/4

Fig. 1

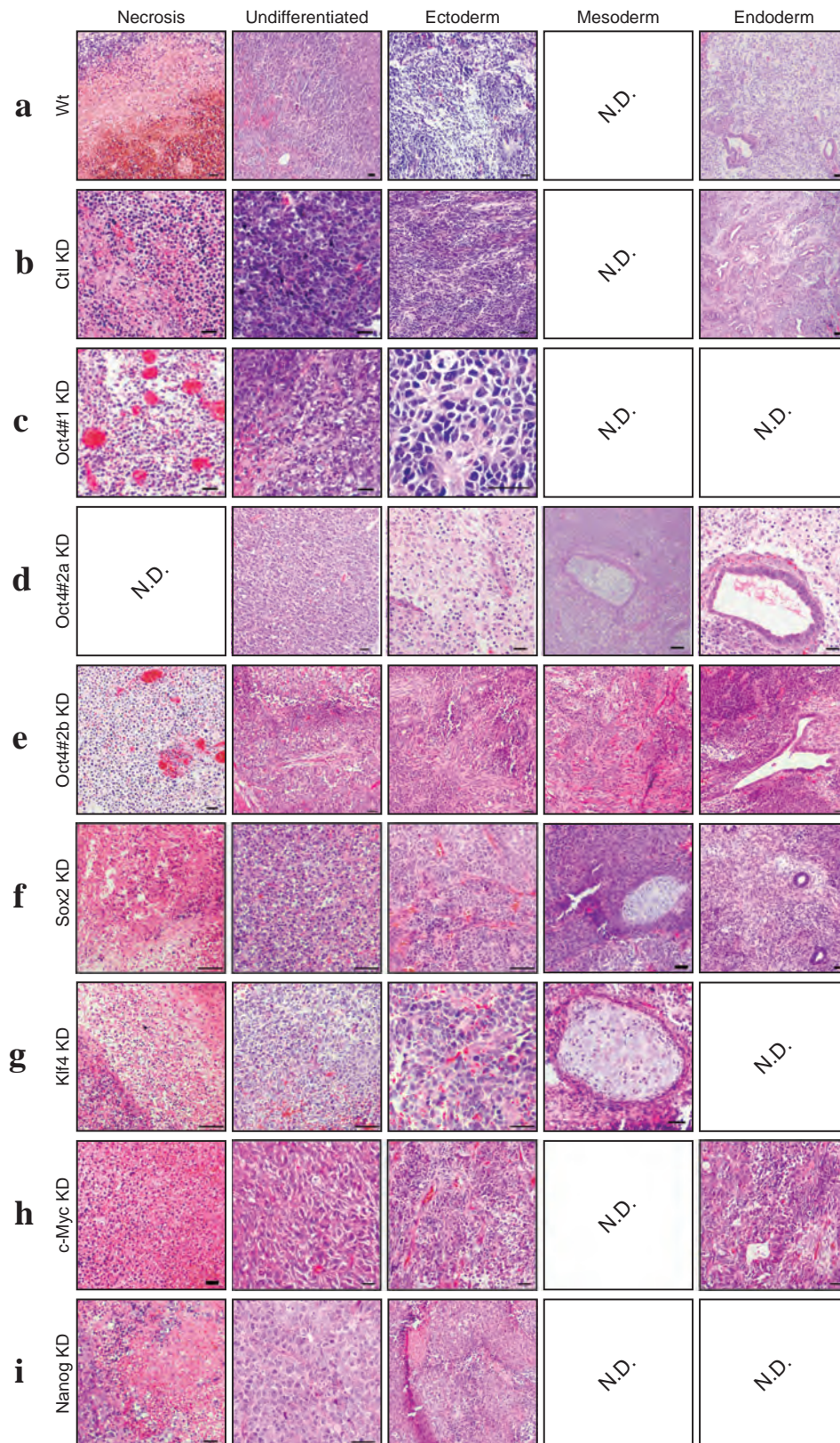


Fig. 1. Histological analysis of teratoma formation using hematoxylin and eosin (H&E) staining. Tumors formed from **a** Wt contained cells only from primitive neuroectoderm and presence of necrosis. Only one sample formed ectoderm. **b** Ctl KD teratomas were formed mainly by undifferentiated, neuroectoderm tissue

and necrosis. **c** Oct4#1 KD tumors presented only undifferentiated and ectoderm cells besides necrotic areas. **d** Oct4#2a-derived teratomas showed absent or small areas of necrosis, formation of cell lineages derived of ectoderm (mature brain tissue), mesoderm (cartilage) and endoderm (gland) plus undifferentiated cells. **e** Oct4#2b tumors presented all three embryonic germ layers (neuroectoderm, muscle and gland), besides presence of undifferentiated cells and necrotic areas. **f** Sox2 KD-derived teratomas contained cells from primitive neuroectoderm, undifferentiated cells and large necrotic area. **g** Klf4 KD-derived teratomas contained cells from primitive neuroectoderm, cartilage, and undifferentiated cells, besides necrotic areas. **h** c-Myc KD-derived teratomas showed absent or small areas of necrosis and contained cells from primitive neuroectoderm, endoderm (glandular tissue) and undifferentiated cells. **i** Nanog KD-derived teratomas showed necrotic areas and presented cells originated from primitive neuroectoderm and undifferentiated cells. Scale bar: 20 μ m.

Two different shRNA sequences for Oct4 were used to knockdown this gene in P19 cells (Supplementary Table 1). The first sequence, Oct4#1, resulted in a very robust silencing (Supplementary Fig. 2a) compared to Wt and Ctl KD. On the other hand, the second sequence generated two clones: Oct4#2a, which presented a reduction in the Oct4 expression; and Oct4#2b, with absence of Oct4 but with the presence of one Oct4 pseudogenes (Supplementary Fig. 2a).

Oct4#1-derived tumors presented undifferentiated cells with surrounding necrotic areas, and a small area of ectoderm (Fig. 1c), but no histological detectable mesoderm or endoderm. Ectoderm-derived tissue was confirmed by IHC, whereas only a faint staining was observed for a mesoderm marker in one out of three samples (Fig. 2c). Oct4#2a KD cells formed tissues derived from ectoderm, with mature glia cells; and endoderm, composed of glandular tissue; also presence of undifferentiated tissue and cartilage was seen. No necrosis was observed in tumors derived from these cells (Fig. 1d) and IHC was positive for all markers (Fig. 2d). Lastly, Oct4#2b KD formed tumors composed from all three embryonic germ layers: neuroectoderm, mesoderm (muscle), and endoderm (glands); undifferentiated tissue and necrosis was also observed (Fig. 1e). IHC analysis were positive for undifferentiated and ectoderm cells, however only one sample showed primitive

mesoderm, possibly due to the differentiation of these cells, as supported by the presence of muscle cells (Fig. 2e).

Table 2 Teratoma differentiation status by immunohistochemistry analysis.

	TRA-1-60	b-Tubulin	Brachyury
Wt	1/3	3/3	2/3
Ctl KD	3/4	3/3	1/3
Oct4#2a KD	2/3	3/3	2/3
Oct4#1 KD	2/3	3/3	1/3
Oct4#2b KD	2/3	3/3	1/3
Sox2 KD	3/3	3/3	2/3
Klf4 KD	2/3	3/3	2/3
c-Myc KD	3/3	3/3	2/3
Nanog KD	2/3	3/3	1/3

Sox2 silencing was confirmed by RT-PCR (Supplementary Fig. 2c) and *in vivo* characterization demonstrated formation of undifferentiated cells, neuroectoderm, mesoderm (cartilage and muscle), and only one sample presented endoderm. The majority of the tumor area analyzed was composed of necrosis (Fig. 1f). IHC confirmed the histological analysis (Fig. 2f).

Stable Klf4 knockdown was confirmed by Western blot (Supplementary Fig. 2b). Klf4 KD-derived tumors formed immature teratomas, with neuroectoderm and undifferentiated cells, besides presence of cartilage and necrotic area (Fig. 1g). IHC for pluripotent cells and differentiated were positive (Fig. 2g).

c-Myc KD cell silencing was confirmed by RT-PCR (Supplementary Fig. 2d). *In vivo* characterization showed immature teratoma formation, with presence of undifferentiated cells, besides neuroectoderm and endoderm tissues. No mesoderm was observed, along with small or absent areas of necrosis (Fig. 1h). IHC showed positive cell for Brachyury, indicating the presence of primitive mesoderm (Fig. 2h).

Nanog KD was confirmed by RT-PCR (Supplementary Fig. 2e) and teratomas derived from Nanog KD cells were similar to Wt and Ctl KD presenting necrotic areas, neuroectoderm and undifferentiated cells (Fig. 1i). Only one sample was positive for mesoderm, and no endoderm was observed. IHC confirmed the histological analysis (Fig. 1i).

Fig. 2

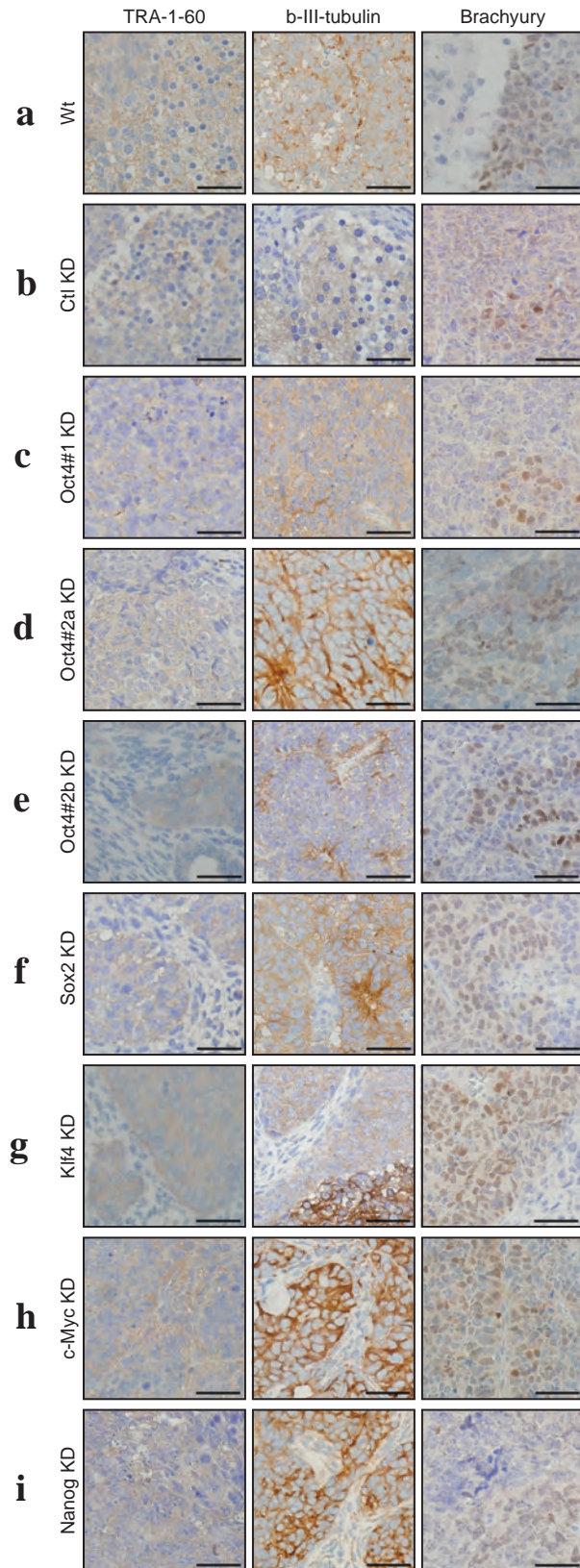


Fig. 2. Immunohistochemistry for pluripotent and differentiated cells in teratomas formed by knockdown cells. TRA-1-60 was used as pluripotent marker, b-III-tubulin for ectoderm, and brachyury for mesoderm. **a**

Wt teratomas presented only positive cells for ectoderm and mesoderm. **b** Ctl KD teratomas had undifferentiated and ectoderm positive cells. **c** Oct4#1 KD tumors presented undifferentiated and ectoderm positive cells. **d** Oct4#2a-derived teratomas showed cells positive for all markers. **e** Oct4#2b tumors were positive for pluripotent and ectoderm cells. **f** Sox2 KD-derived teratomas contained undifferentiated and ectoderm positive cells. **g** Klf4 KD and **h** c-Myc KD-derived teratomas were all positive, except for endoderm. **i** Nanog KD-derived teratomas showed neuroectoderm and undifferentiated positive cells. Scale bar: 50 μm .

3.2 Effect of silencing in tumor growth

Next, we measured the growth rate of the tumors formed by the silenced P19 cells. Oct4#2a, Oct4#2b and Klf4 KD tended to reach this proportion before than Wt cells, while the others cells took a little more days to reach 500 mm^3 , especially Nanog (Fig. 3a and b).

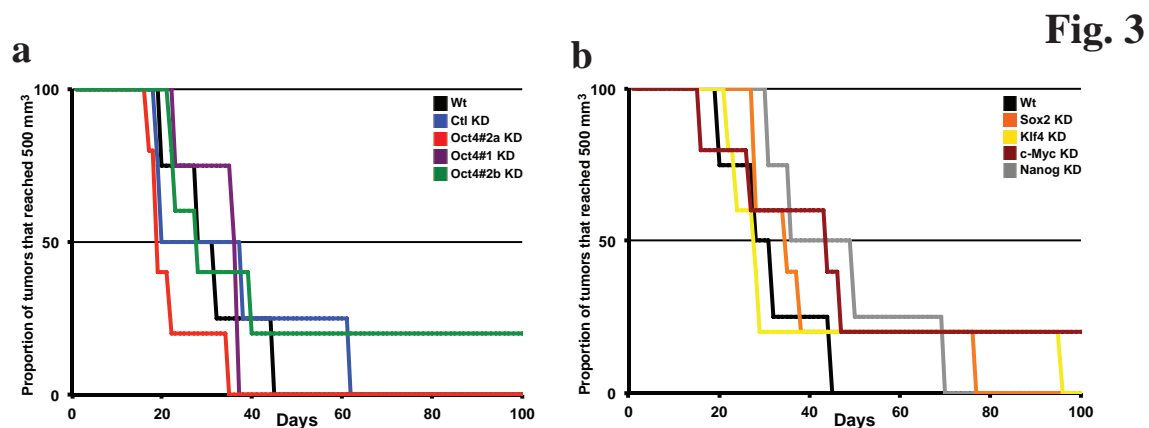


Fig. 3. Kaplan-Meier (KM) analysis to observe the time needed for the tumor to reach 500 mm^3 . **a** KM comparing control cells (wild type – Wt and knockdown control – Ctl KD) with Oct4 KD. **b** KM comparing Wt with Sox2, Klf4, c-Myc and Nanog KD.

4. Discussion

Since the discovery of iPSC, its use was applied most successfully to human disease modeling, in a vast array that includes type I diabetes, Alzheimer's, and Parkinson's diseases [13]. The other important potential use, cell replacement therapy, has not been fulfilled mostly due to the risk of teratoma formation, despite the decreased risk using cells in a more differentiated state [17,18,19].

Notwithstanding, implantation of predifferentiated cardiac cells derived from etoposide-treated mouse iPSC reduced by 10-fold the teratoma formation by abolishing the remaining undifferentiated cells [7].

Here, we tested the impact of silencing the factors used to generate iPSC in the growth and differentiation state of teratomas. Oct4 is the main transcription factor to generate iPSC and is used as a specific marker of TGCT, since its highly expressed in tumors with more undifferentiated features, and absent expression in differentiated components [14]. Some of Oct4 pseudogenes (Oct4-pg1, pg3 and pg4) have a high sequence homology to Oct4A and share the unique N-terminal coding sequence and have similar protein size [15, 16]. Therefore, the Oct4 antibody used in this study can also detect Oct4 pseudogenes, thus, the presence of a low band in Oct4#2b, and present only weak in Wt and Ctl KD (Supplementary Fig. 1a), can be the expression of one of Oct4 pseudogenes. The role of Oct4 pseudogenes are not completely understood, but they can act as regulators, such as miRNA sponge protecting Oct4 transcript from inhibition [15].

The robust silencing of Oct4 with the Oct4#1 led to a reduction in the formation of mesoderm and endoderm. Interestingly, another shRNA sequence which reduced the expressed of Oct4 by about 50% or, in a separate clone, with the appearance of a putative pseudogene, led to the formation of mature brain cells, cartilage and gland plus undifferentiated tissue, suggesting that a small amount or event the presence of a pseudogene is sufficient to allow the formation of these tissues, in contrast to the shRNA sequence that lead to a large reduction in Oct4.

Sox2 is expressed in primitive neuroepithelium cells in immature teratomas of the central nervous system, whereas it is limited to the epithelium with endodermal origin in the mature ones [17]. Among the factors tested, Sox2 KD presented undifferentiated and differentiated tissue, especially ecto and mesoderm, only one sample showed differentiation towards endoderm. The main characteristic of these KD tumors was the increased necrosis, which represented 50 % or more of the tumor formed (data not shown).

Klf4 is capable of promoting the self-renewal of ESCs by activating several genes, such as Nanog, Oct4 and Sox2; and its expression is involved in the commitment of pluripotent cells to endodermal

differentiation, since its absence increases differentiation towards definitive endoderm [18, 19]. A different result concerning the differentiation status of the teratoma formed by Klf4 KD cells was observed, wherein no endoderm was seen, and this divergent result may be because the silencing was not complete and the remaining cells expressing this gene can be preventing differentiation towards endoderm.

c-Myc is an important proto-oncogene that regulates several genes involved in various cellular processes, and loss of its expression reduces cell growth and promotes differentiation, besides sensitizes cells to DNA damage [20–23]. In mouse ESCs, its absence decrease self-renewal potential and drive to early differentiation of all three embryonic germ layers, although no fully differentiated cell is observed [24]. Similar, in colon cancer, the presence of c-Myc correlated with more undifferentiated and proliferative tumors [25]. We observed that tumors derived from c-Myc KD cells presented undifferentiated cell, but were mainly composed of primitive neuroectoderm, endoderm and mesoderm precursors.

In TGCT, Nanog presents similar expression profile as Oct4, being highly expressed in tumors with undifferentiated features, but low or absent expression in differentiated tumors components [14, 26]. Moreover, Nanog expression is one of the responsible to avoid differentiation into endoderm in ESCs [27, 28]. For this reason, it would be expected to observe differentiation towards endoderm with Nanog KD cells, but no formation of gland or other endoderm-derived cells, or mesoderm was detected; and only one sample was positive for primitive mesoderm. Nanog KD cells tumors were formed basically by undifferentiated and neuroectoderm cells.

The YFs plus Nanog work in combinatory complexes in order to regulate the expression of its targets genes, which are involved in the pluripotency maintenance and cell differentiation [10]. In order to keep an undifferentiated state, a fine tune expression of Oct4 and Sox2 is need, and, together with Nanog, they form a complex that activate / repress mutual target genes [10,11]. The absence of Oct4 or Sox2 induces ESCs to differentiate into trophectoderm, while Nanog or Klf4 absence lead to endoderm differentiation [12–14]. This differentiation tendency was observed in ESCs and no data regarding ECCs was described. Thus, perhaps because of the different

tumorigenic status between ECCs and ESCs, these cells were not able to form endoderm. Furthermore, teratomas are formed mainly by ectoderm cells and also mesoderm can be observed; however differentiation toward endoderm components is rare [14]. Klf4 is also capable of a direct interaction with Oct4, Sox2 and Nanog; and c-Myc acts enhancing reprogramming and increases efficiency [15,16]. Probably for these reason, knocking down the transcription factors alone was not able to avoid the formation of teratomas and targeting more than one gene would be a more effective way to avoid tumor formation.

5. Abbreviations

c-Myc - V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

ESCs – embryonic stem cells

iPSC – induced pluripotent cells

KD – knockdown by shRNA

Klf4 – Krüppel-like factor

Oct4 – Octamer 4

P19 – murine teratocarcinoma cell line

Sox2 - SRY-related high mobility group box 2

TCGT – testicular germ cell tumors

YF – Yamanaka Factors (Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc)

6. Funding

This work was financially supported by Programa Binacional de Terapia Celular of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROBITEC/CAPES) 907/2012. Structural support for in vivo experiments was provided by Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) FIPE-150109.

7. Acknowledgements:

The authors thank Emily Ferreira Salles Pilar and Flavia Rejane Giusti for the help in immunohistochemistry, and Marcos Paulo Thomé for helping in Kaplan-Mayer analysis.

8. Conflicts of interest

All authors disclose no conflicts of interest.

9. References

1. I. Damjanov, The road from teratocarcinoma to human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* **1**, 273–276 (2005).
2. H. Isaacs Germ Cell Tumors. In: Tumors of the Fetus and Infant. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **Chapter 5**, 5–29 (2013)
3. X. Bustamante-Marín, J.A. Garness, B. Capel, Testicular teratomas: An intersection of pluripotency, differentiation and cancer biology. *Int J Dev Biol* **57**, 201–210 (2013)
4. I. Chambers, A. Smith, Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* **23**, 7150–7160 (2004)
5. K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006)
6. J. Yu, M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I.I. Slukvin, J.A. Thomson, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007)
7. S.P. Wyles, S. Yamada, S. Oommen, J.J. Maleszewski, R. Beraldi, A. Martinez-Fernandez, A. Terzic, T.J. Nelson, Inhibition of DNA topoisomerase II selectively reduces the threat of tumorigenicity following induced pluripotent stem cell-based myocardial therapy. *Stem Cells Dev* **23**, 1–27 (2014)
8. Kawamata S, Kanemura H, Sakai N, M. Takahashi, M. Go, Design of a tumorigenicity test for induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cell products. *J Clin Med* **4**, 159–171 (2015)
9. Lim TT, Geisen C, Hesse M, B.K. Fleischmann, K. Zimmermann, A. Pfeifer, Lentiviral vector mediated thymidine kinase expression in pluripotent stem cells enables removal of tumorigenic cells. *PLoS One* **8**, e70543 (2013)
10. M.W. McBurney, B.J. Rogers, Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol* **89**, 503–508 (1982)
11. M.W. McBurney, P19 embryonal carcinoma cells. *Int J Dev Biol* **37**, 135–40 (1993)
12. G. Bain, W.J. Ray, M. Yao, D.I. Gottlieb, From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway. *Bioessays* **16**, 343–348 (1994)
13. M. Stadtfeld, K. Hochedlinger, Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* **24**, 2239–2263 (2010)
14. C.J. Giuliano, S.J. Freemantle, M.J. Spinella, Testicular germ cell tumors: a paradigm for the successful treatment of solid tumor stem cells. *Curr Cancer Ther Rev* **2**, 255–270 (2006)
15. E.S. Villodre, F.C. Kipper, M.B. Pereira, G. Lenz Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. *Cancer Treat Rev* **51**, 1–9 (2016)
16. M. Jez, S. Ambady, O. Kashpur, A. Grella, C. Malcuit, L. Vilner, P. Rozman, T. Dominko, Expression and differentiation between OCT4A and its pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells. *PLoS One* **9**, e89546 (2014)
17. J.H. Phi, S.-H. Park, S.H. Paek, S.-K. Kim, Y.J. Lee, C.-K. Park, B.-K. Cho, D.-H. Lee, K.-C. Wang, Expression of Sox2 in mature and immature teratomas of central nervous system.

- Mod Pathol **20**,742–748 (2007)
18. C.S. Park, Y. Shen, A. Lewis, H.D. Lacorazza, Role of the reprogramming factor KLF4 in blood formation. *J Leukoc Biol* **99**,673–685 (2016)
 19. I. Aksoy, V. Giudice, E. Delahaye, F. Wianny, M. Aubry, M. Mure, J. Chen, R. Jauch, G.K. Bogu, T. Nolden, H. Himmelbauer, M. Xavier Doss, A. Sachinidis, H. Schulz, O. Hummel, P. Martinelli, N. Hübner, L.W. Stanton, F.X. Real, P.-Y. Bourillot, P. Savatier, Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat Commun* **5**,1–15 (2014)
 20. M. Elend, M. Eilers, Cell growth: Downstream of Myc - To grow or to cycle? *Curr Biol* **9**,936–938 (1999)
 21. J.P. Morton, O.J. Sansom, MYC-y mice: From tumour initiation to therapeutic targeting of endogenous MYC. *Mol Oncol* **7**,248–258 (2013)
 22. G. Ott Impact of MYC on malignant behavior. *Hematology* **2014**,100–106 (2014)
 23. A.M. Petrich, C. Nabha, S.M. Smith, MYC-associated and double-hit lymphomas: A review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. *Cancer* **120**,3884–3895 (2014)
 24. N.V. Varlakhanova, R.F. Cotterman, W.N. DeVries, J. Morgan, L.R. Donahue, S. Murray, B.B. Knowles, P.S. Knoepfler, myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation* **80**,9–19 (2010)
 25. C.W. Taylor, Y.S. Kimb, K.E. Childress-Fields, L.C. Yeoman, Sensitivity of nuclear c-myc levels and induction to agents in human colon tumor cell lines. *Cancer Lett* **62**,95–105 (1992)
 26. A.H. Hart, L. Hartley, K. Parker, M. Ibrahim, L.H.J. Looijenga, M. Pauchnik, C.W. Chow, L. Robb, The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer* **104**,2092–2098 (2005)
 27. I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, A. Smith, Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**,643–655 (2003)
 28. K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, S. Yamanaka, The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* **113**,631–642 (2003)

10. Supplementary Material and Methods

shRNAi Transduction

shRNAi sequences were obtained from a Mission RNAi library in a pLKO.1 plasmid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA); the sequence used to silence Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc and Nanog are described in supplementary table I. Lentivirus production was performed by co-transfecting Hek 293t cells with PEI reagent (Polysciences #23966-2) complexed with three virus packaging plasmids: (1) RRE, (2) Rev, and (3) VSVG, and the shRNAi expression plasmid containing a puromycin resistance gene. As a control of transduction, we used a GFPi plasmid stable RNA interference with a sequence targeting GFP (shGFP - SHC005). The supernatants were collected after 72 h and 96 h, filtered with 45- μ m filter membrane, and added to P19 culture plus polybrene 8 μ g/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and spin infection was performed for 45 min at 750 g.

One-micromolar puromycin (GIBCO, Grand Island, NY, USA) selection was performed for 10 days after 72 h of transduction.

RT-PCR

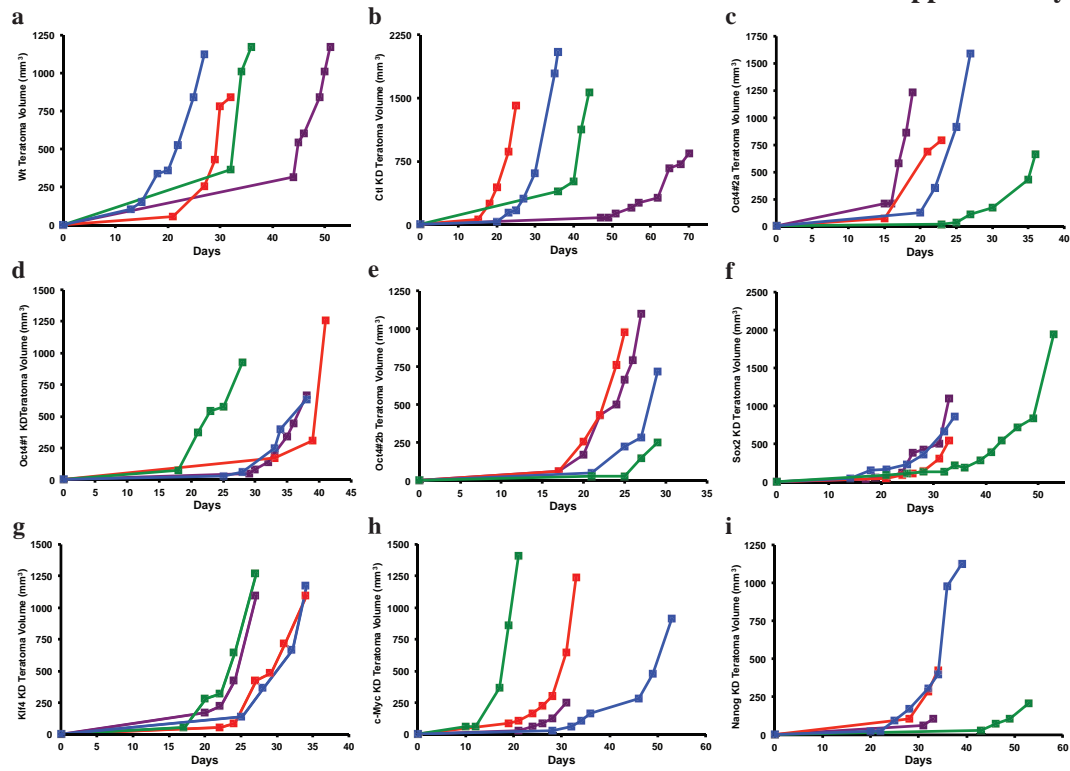
Total RNA from P19 wild type or knocked-down cell cultures was isolated with Trizol LS reagent (Life Technologies) and chloroform-isopropanol extraction. DNase was used to eliminate any DNA residue. The cDNA was synthesized with M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (Promega) from total RNA with poliT primer.

Western Blotting

P19 wild type or knocked-down for Oct4 and Klf4 cells were lysed with a lysis solution containing Triton, Tris, EDTA and EGTA, and quantified using Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Same amounts of protein were used in SDS-PAGE. Proteins were transferred to PVDF membrane and blocked with 5 % nonfat dry milk in 1 × TTBS. The membrane was incubated overnight with the primary antibody against Oct4 (1:800, sc-5279, Santa Cruz) or Klf4 (1:800, sc-20691, Santa Cruz); followed by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000, Cell Signaling) for 2 h at 4 °C. Chemoluminescence was detected using ECL and x-ray films (Kodak). Membrane was stained with comassie blue for protein load control.

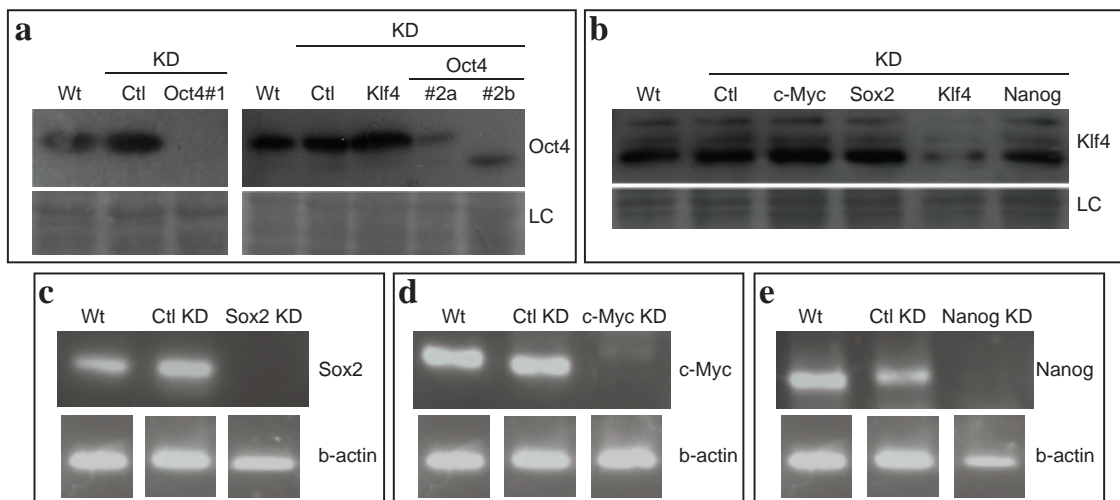
11. Supplementary Figure

Supplementary Fig. 1



Supplementary Fig. 1. Teratomas tumor volume (mm^3) formed in each cell line. Teratomas formed by the injection of **a** Wild type (Wt) cells, **b** Knockdown control (Ctl KD), **c** Oct4#2a KD, **d** Oct4#1 KD, **e** Oct4#2b KD, **f** Sox2 KD, **g** Klf4 KD, **h** c-Myc KD, **i** Nanog KD. Each color in the graph indicates one animal that formed teratoma.

Supplementary Fig. 2



Supplementary Fig. 2. Knockdown (KD) confirmation. **a** P19 cell line were infected with two different shRNA sequences (Oct4#1 and Oct4#2). The second sequence generated two clones with different Oct4 expression (Oct4#2a and Oct4#2b). Wild type P19 cells (Wt) and shRNA control (Ctl KD) were used as control cells. Western blot was performed to confirm silencing and loading control (LC) was used as control for the quantity of protein applied. **b** Klf4 KD was confirmed by western blot. **c-e** RT-PCR was used to confirm KD and b-actin used as internal control. **c** Sox2 KD, **d** c-Myc KD and **e** Nanog KD.

12. Supplementary Table

Supplementary Table 1. Identity of the shRNA clones used.

Gene	Gene ID	Clone ID	Cell line name
Oct4	18999	NM_013633.1-659s1c1	Oct4#1 KD
		NM_013633.1-544s1c1	Oct4#2a KD
			Oct4#2b KD
Klf4	16600	NM_004235.3-1716s1c1	Klf4 KD
Sox2	20674	NM_003106.2-1060s21c1	Sox2 KD
Nanog	71950	XM_132755.3-122s1c1	Nanog KD
c-Myc	17869	NM_002467.4-952s21c1	Myc KD
GFP	-	SHC005	Ctl KD

CAPÍTULO III

“Importance of Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc or Nanog expression in the treatment response using cisplatin and etoposide in P19 teratocarcinoma cells.”

Status: submetido.

Revista: Cancer Medicine.

Importance of Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc or Nanog expression in the response to cisplatin and etoposide in P19 teratocarcinoma cells.

Emilly Schlee Villodre¹, Mayumi Zanotta Oyama¹ and Guido Lenz^{1,2}

¹ Laboratory of Cellular Plasticity and Signaling, Department of Biophysics, Institute of Biosciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Center of Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence to: Guido Lenz

Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43431 Lab 115, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Telephone: +55 51 33087620; fax: +55 51 33087613

E-mail: lenz@ufrgs.br

Abstract

Testicular germ cell tumors (TGCT) are one of the most curable solid tumors, however some patients are resistant to the treatment with cisplatin, etoposide and bleomycin. Presence of a population with stemness feature such as cancer stem cells (CSCs) is an important player in tumor recurrence and resistance. Teratocarcinomas, one of many types of TGCT, present a population, named embryonic carcinoma cells, which resemble CSCs and can thus be the responsible for recurrence. We separately knocked down (KD) the transcription factors Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc and Nanog known for their importance in the maintenance of stemness in P19 teratocarcinoma cell line to check their association with sensitivity to treatment *in vitro*. Reduction in the expression of Klf4 and c-Myc increased cisplatin sensitivity alone or combined with etoposide, while Oct4 and Sox2 KD did not affect response to these treatments. Nanog KD sensitized cells only to cisplatin treatment. Thus, the silencing of the transcription factors can sensitize P19 cells to cisplatin and etoposide, being Nanog the exception and these genes may be considered for tackling the resistance of teratocarcinomas to these therapies.

Keywords teratocarcinoma, yamanaka factors, knockdown, P19 cell line, cisplatin, etoposide

Introduction

Testicular germ cell tumors (TGCT) are one of the most curable solid tumors, when treated with various cycles of bleomycin, etoposide and cisplatin (BEP) (1,2). Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II, CDDP) is an effective chemotherapeutic agent widely used since the 70's for the treatment of various cancers, such as testicular, ovarian, head and neck, and cervical cancers (3–5). CDDP acts mainly through the formation of covalent DNA adducts between two guanines at the position N7 (6). Etoposide (VP-16) is a semisynthetic derivative of podophyllotoxin and exerts its toxic activity by binding and inhibiting the action of topoisomerase II enzyme, being used as standard therapy in small cell lung carcinoma, malignant lymphoma, leukemia and Kaposi's sarcoma (7,8).

Despite this efficient treatment, TGCT relapses in some patients and cancer stem cells (CSCs) were implicated as part of the mechanism of resistance and recurrence (9,10). Teratocarcinomas, a type of TGCT, are formed by a mixture of differentiated cells and embryonic carcinoma cells (ECCs), the malignant counterpart of embryonic stem cells (ESCs) (11–14). Therefore, we hypothesize that the presence of genes that are responsible for stemness, such as Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc and Nanog, can interfere in the treatment response of TGCT patients that present resistance. Here, our study shows that knocking down most, but not all, of these genes sensitizes the P19 teratocarcinoma cell line to CDDP and/or VP-16 treatment *in vitro*.

Materials and Methods

Cell Culture

Mouse teratocarcinoma P19 cells (ATCC[®] CRL1825[™]) obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's

medium (DMEM) low glucose, penicillin (100 U / mL) and streptomycin (100 g / mL) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS). Cells were maintained in a 5 % CO₂ humidified incubator at 37 °C. DMEM, FBS, penicillin, streptomycin and B27 were purchased from Gibco (BRL).

shRNAi Transduction

shRNAi sequences were obtained from a Mission RNAi library in a pLKO.1 plasmid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA); the sequence used to silence Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc and Nanog are described in supplementary table 1. Lentivirus production was performed by co- transfecting Hek 293t cells with PEI reagent (Polysciences #23966-2) together with three virus packaging plasmids: (1) RRE, (2) Rev, and (3) VSVG, and the shRNAi expression plasmid containing a puromycin resistance gene. As a control of transduction, we used a GFPi plasmid stable RNA interference with a sequence targeting GFP (shGFP - SHC005). The supernatants were collected after 72 h and 96 h, filtered with 45-µm filter membrane, and added to P19 culture plus polybrene 8 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and spin infection was performed for 45 min at 750 g. One-micromolar puromycin (GIBCO, Grand Island, NY, USA) selection was performed for 10 days after 72 h of transduction.

RT-PCR

Total RNA from P19 wild type or knocked-down cell cultures was isolated with Trizol LS reagent (Life Technologies) and chloroform-isopropanol extraction. DNase was used to eliminate any residual DNA. The cDNA was synthesized with M-MLV Reverse Transcriptase enzyme (Promega) from total RNA with poliT primer. One microliter of the RT reaction mix was used as a template for PCR using a concentration of 0.5 mM of each

primer and 0.5 units of Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich). As a control for cDNA synthesis, β -actin PCR was performed. Products of the PCR reaction were analyzed on a 1 % agarose gel stained with 1 μ l of Safe Dye (Kasvi). The gene-specific primer pairs were as follows: Sox2 (F) 5'-TCAAGGCAGAGAAGAGAGTGTTT-3', Sox2 (R) 5'-GCCGCCGCGATTGTTGTGAT-3', c-MYC (F) 5'-GCCAGCCCTGAGC CCCTAGT-3', c-MYC (R) 5'-CGGCGTAGTTGTGCTGGTGAGT-3', Nanog (F) 5'-TGAAGTGCAAGCGGTGGCAGA-3', Nanog (R) 5'-GGTCCAGGTCTGGTCGTCCC A-3', b-actin (F) 5'-GAGACCTTCAACACCCCAG-3', b-actin (R) 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGC-3'.

Western Blotting

P19 wild type or knocked-down for Oct4 and Klf4 cells were lysed with a lysis solution containing Triton, Tris, EDTA and EGTA, and quantified using Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). The same amounts of protein was used in SDS-PAGE. Proteins were transferred to PVDF membrane and blocked with 5 % nonfat dry milk in 1 \times TTBS. The membrane was incubated overnight with the primary antibody against Oct4 (1:800, sc-5279, Santa Cruz) or Klf4 (1:800, sc-20691, Santa Cruz); followed by incubation with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:2000, Cell Signaling) for 2 h at 4 °C. Chemoluminescence was detected using ECL and x-ray films (Kodak). Membrane was stained with comassie blue for protein load control.

Cumulative Population Doubling (CPD)

Wild type or knocked-down P19 cells were plated at a density of 250 cells per well in a 12-well plate. After 24 h, cells were treated with cisplatin 25 μ M, etoposide 34 μ M or its combination for 5 days, after which cells were counted using a hemocytometer and grown

thereafter in drug free medium during 30 days. The handling of cells was performed when they reached around 80 % confluence. The re-seeding of cells was performed using 2.5 % of the re-suspended cells. The Initial Number (IN) and the Final Number (FN) of cells of each analyzed interval were plotted in the following formula to obtain the Population Doubling (PD) value: $PD = (\ln(FN) - \ln(IN)) / \ln(2)$. The sum of successive PDs created the Cumulative Population Doubling (CPD).

CPD parameters

All the parameters were analyzed as previously described (15). Briefly, to obtain RendCPD (relative end CPD) we performed the ratio between the last CPD of treated group in relation to untreated group, in order to quantify the end point analysis of proliferation. RTCT (Relative Time to Cross a Threshold) and RPR (Relative Proliferation Rate) were obtained using the linear regression of both treated and untreated groups. RTCT was determined by the ratio between the control and treated Time to Cross the Threshold (TCT), *i.e.*, a threshold set on a CPD value of 15, and indicates the delay caused by the treatment in the cell population regrowth compared to the untreated group. RPR is the ratio of the angular coefficients of treated and untreated groups, and describes the relative regrowth velocity of the cells that survived after treatment.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM and ANOVA followed by Tukey for multiple comparisons was performed with the aid of the Prism 7 (GraphPad Software).

Results

P19 cells show higher resistance to plasmatic levels of cisplatin than etoposide or their combination

Cumulative Population Doubling (CPD) curves of P19 cells indicated a fast growth rate, with an average doubling time of around 14 h. Teratoma treatment regimen consisted in 5 days cycles using cisplatin at a daily dose of 20 mg/m², etoposide ranging from 50-120 mg/m² and bleomycin at 20 IU/m² (16). Plasma cisplatin concentration reaches between 10-25 μM, while etoposide can reach around 46 μM (17,18). To best mimic this treatment regimen, we treated the cells with five days of cisplatin 25 μM (CDDP) and/or etoposide 34 μM (VP-16). Under these conditions, CDDP did not significantly alter the growth of WT and Ctl KD cells over a period of 30 days whereas VP-16 and the combination of CDDP and VP-16 lead to a significant reduction in the cell population growth (Fig. 1a and b).

Effect of knocking down Oct4 in P19 cells

Two shRNA sequences were used to knockdown Oct4 in P19 cells (Supplementary Table 1). The first sequence, Oct4#1, produced a near complete silencing (Fig. 1c) compared to Wt and Ctl knockdown (KD), whereas the second sequence generated a clone (Oct4#2a), in which Oct4 expression was reduced; and a second clone Oct4#2b, in which the main protein product of Oct4 was reduced to undetectable levels, but a lower MW band appeared on Oct4 western blots, which possibly is a Oct4 pseudogenes (Fig. 1c). Partial reduction in Oct4 expression produced by Oct4#2a protected the cells against VP-16 and the combination (Fig. 1e) whereas Oct4#2b had neither a sensitizing nor protective effect (Fig. 1f). The near complete deletion of Oct4 produced by Oct4#1 significantly sensitized

cells to the combination (Fig. 1g) suggesting that Oct4 plays a role in the response to etoposide and the combination, but not to cisplatin alone. Of note, KD of Oct4 did not affect the morphology of the cells (Fig. 1d) nor de basal population growth rate.

We calculated three CPD parameters recently proposed by our group to improve data visualization of CPD results (15). RendCPD (Relative end CPD) was used to quantify the end point analysis of proliferation on day 30. RTCT (Relative Time to Cross a Threshold) is calculated to compare the growth delay caused by the treatment, while RPR (Relative Proliferation Rate) indicates the relative regrowth velocity after treatment. This analysis confirmed the sensitizing effect of complete silencing obtained in Oct4#1 and the protective effect of partial silencing obtained in Oct4#2a to the two drugs, but not either drug alone (Fig. 1h, i and j).

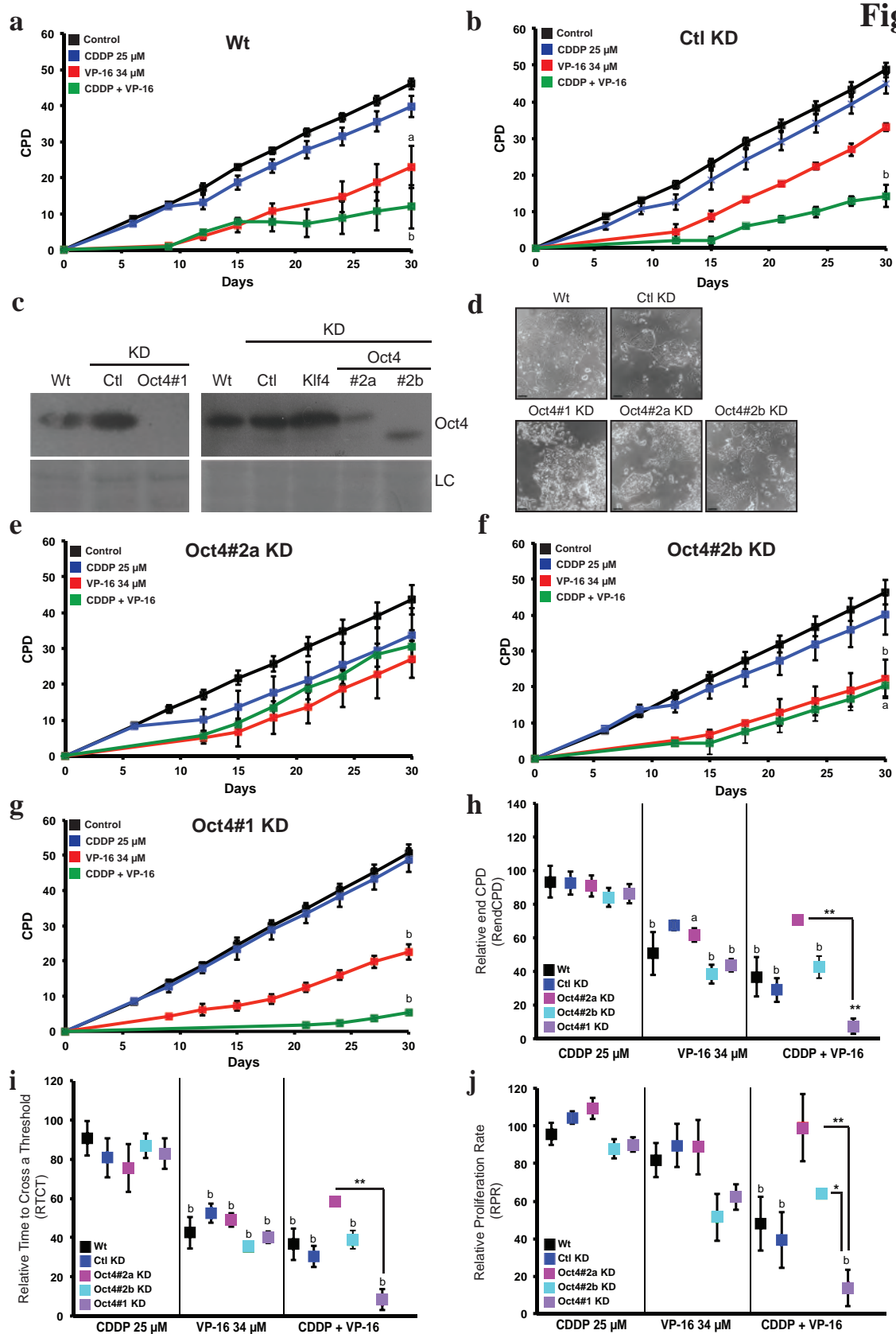


Fig. 1. Characterization of Wild type (Wt), silencing control (Control KD) cells and Oct4 knockdown (KD) cells. **a** Oct4 silencing confirmation. P19 cell line was infected with two different shRNA sequences (Oct4#1

and Oct4#2). The second sequence generated two clones with different Oct4 expression (Oct4#2a and Oct4#2b). Wild type P19 cells (Wt) and shRNA control (Ctl KD) were used as control cells. Western blot was performed to confirm silencing and loading control (LC) was used as control for the quantity of protein applied. **b** Representative image of the aspect of Oct4 KD cells compared to Wt and Ctl KD. Scale bar: 100 μm . **c-f** Cumulative population doubling (CPD) was performed to evaluate cell proliferation of **c** Wt, **d** Ctl KD, **e** Oct4#2a, **f** Oct4#2b and **g** Oct4#1 after 5 days of treatment with cisplatin (CDDP) 25 μM , etoposide (VP-16) 34 μM or the combination. **h** Relative end CPD (RendCPD) is the ratio between the last CPD day (30th day) of treated and control cells and indicates the proliferation capacity. **i** Relative Time to Cross a Threshold (RTCT) was performed to observe if the treatment was able to delay the cell regrowth, while **j** Relative Proliferation Rate (RPR) parameter describes the relative regrowth velocity of the remaining cells. Results represent the mean (\pm SEM); a = $p < 0.05$; b = $p \leq 0.01$ in relation to non-treated cells. * = $p < 0.05$; ** = $p \leq 0.01$.

Knocking down Sox2 has little effect on the sensitivity to treatment

Sox2 silencing was confirmed by RT-PCR (Fig. 2a) and the morphology of the colonies presented a less compact appearance when compared to control cells (Fig. 2b). Sox2 KD cell number was reduced after VP-16 alone and combination with CDDP compared to non-treated (Fig. 2c and d). Furthermore, cells with combined treatment regrew much slower, as indicated by the very low RPR and RTCT (Fig. 2e and f). However, Sox2 KD did not significantly alter the sensitivity of cells in relation to WT or control KD cells.

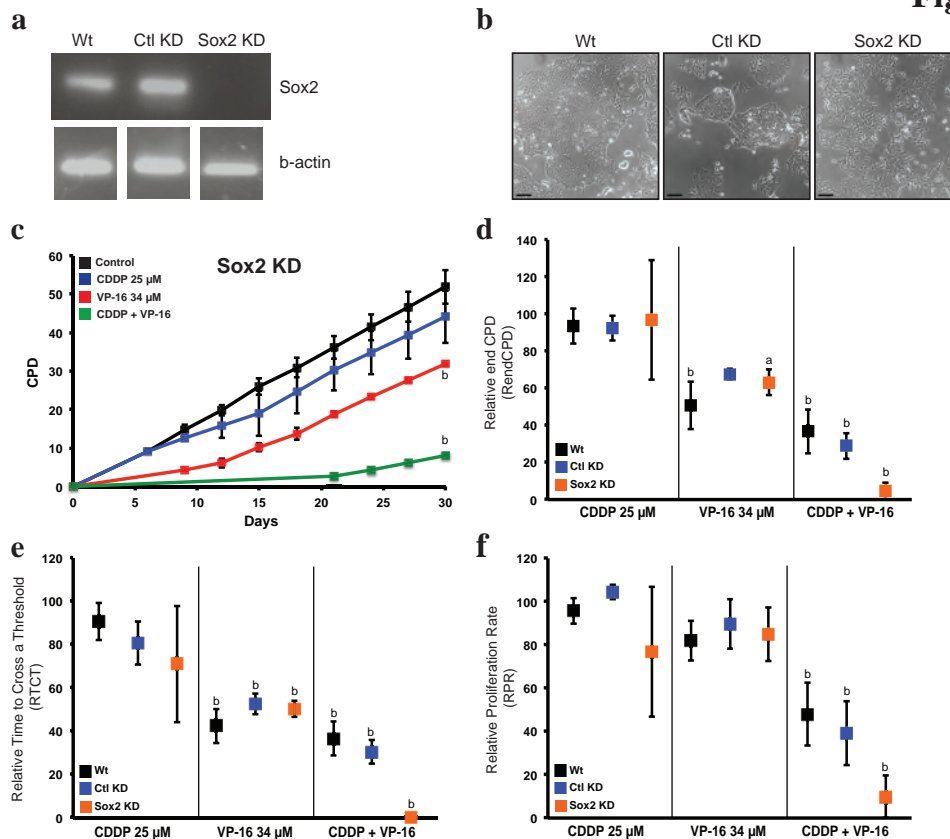
Fig. 2

Fig. 2. Sox2 knockdown (KD) cells are sensitive to combined therapy with cisplatin (CDDP) and etoposide (VP-16). **a** Sox2 silencing confirmation. RT-PCR was used to confirm KD and b-actin used as internal control. **b** Representative image of the aspect of Sox2 KD cells compared to Wt and Ctl KD. Scale bar: 100 μ m. **c** Cumulative population doubling (CPD) was performed to evaluate cell proliferation of Sox2 KD cells after 5 days of treatment with CDDP 25 μ M, etoposide VP-16 34 μ M or the combination. **d** Relative end CPD (RendCPD) indicates the proliferation capacity and it was calculated as the ratio between treated and control cells with the last CPD day value. **e** Relative Time to Cross a Threshold (RTCT) was performed to observe if the treatment was able to delay the cell regrowth, while **f** Relative Proliferation Rate (RPR) parameter describes the relative regrowth velocity of the remaining cells. Results represent the mean (\pm SEM); a = $p < 0.05$; b = $p \leq 0.01$ in relation to non-treated cells.

Klf4 knockdown sensitizes cells to CDDP

Stable Klf4 knockdown was achieved by a lentiviral vector using a shRNA sequence on P19 cells. Reduction in the expression was confirmed by Western blot (Fig. 3a). Visual

analysis of cell morphology showed colonies that are less compact when compared to WT and control KD cells (Fig. 3b). Klf4 KD cells were significantly more sensitive to CDDP (Fig. 3c), when compared with Wt CDDP-treated cells (Fig. 3d). Moreover, all treatment slowed the regrowth (Fig. 3e), and even when cells returned to proliferate, the rate was lower than non-treated cells (Fig. 3f), but this velocity was not different when compared to WT or control KD cells.

Fig. 3

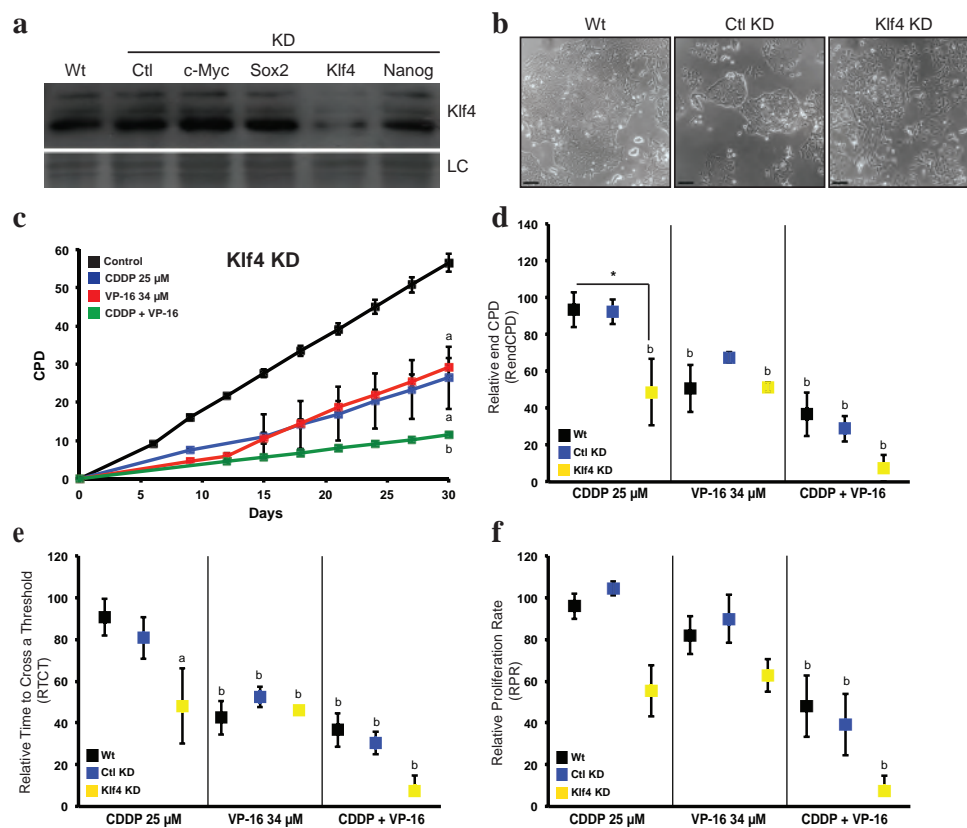


Fig. 3. Klf4 knockdown (KD) cells are sensitive to treatment with cisplatin (CDDP), etoposide (VP-16) and combination. **a** Klf4 KD was confirmed by western blot and loading control (LC) was used as control for the quantity of protein applied. **b** Representative image of the aspect of Klf4 KD cells compared to Wt and Ctl KD. Scale bar: 100 μ m. **c** Cumulative population doubling (CPD) was performed to evaluate cell proliferation of Klf4 KD cells after 5 days of treatment with CDDP 25 μ M, VP-16 34 μ M or the combination. **d** RendCPD (Relative end CPD) indicates the proliferation capacity. **e** RTCT (Relative Time to Cross a Threshold) was performed to observe if the treatment was able to delay the cell regrowth, while **f**

RPR (Relative Proliferation Rate) parameter describes the relative regrowth velocity of the remaining cells. Results represent the mean (\pm SEM); a = $p < 0.05$; b = $p \leq 0.01$ in relation to non-treated cells. * = $p < 0.05$.

Cisplatin alone or combined to etoposide sensitizes c-Myc KD cells

c-Myc cell silencing was confirmed by RT-PCR (Fig. 4a) and morphology was different compared to control, as the colonies were less compact with cells having a more prolonged shape (Fig. 4b). c-Myc KD sensitized cells to CDDP but not to VP-16. The combination of the two drugs leads to a complete elimination of the c-Myc KD cells (Fig. 4c, d). However, despite the increased acute toxicity of CDDP on c-Myc KD cells (Fig. 4f), the surviving cells regrew as fast as the untreated ones (Fig. 4f).

Fig. 4

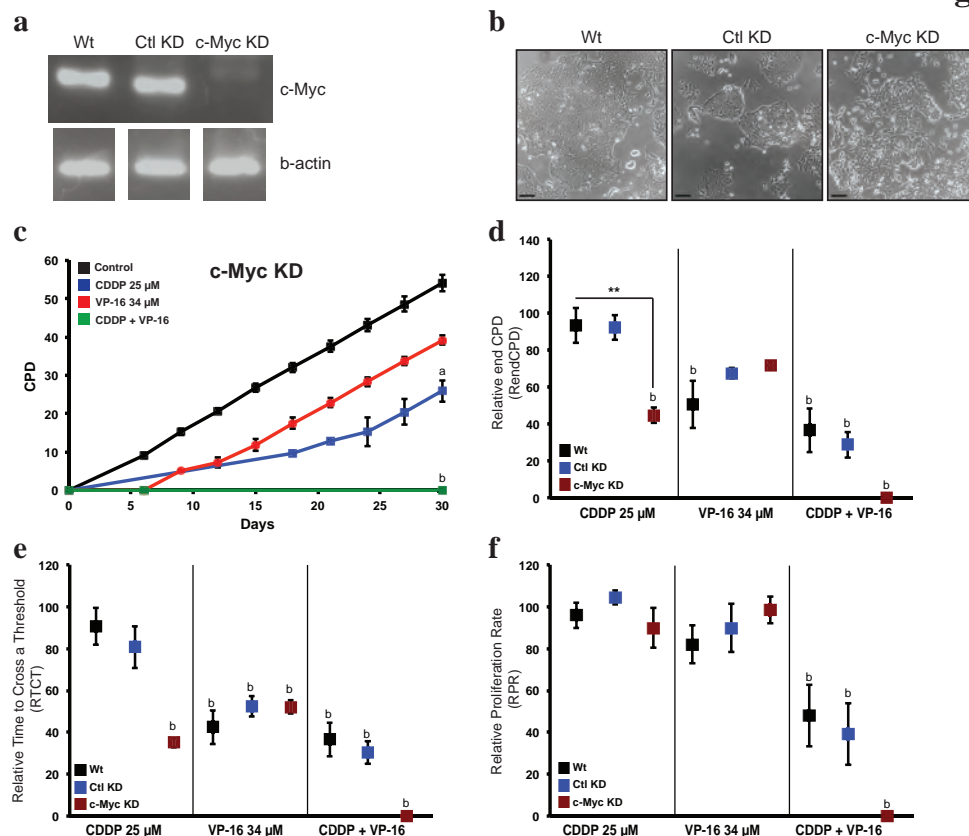


Fig. 4. c-Myc knockdown (KD) cells are sensitive to cisplatin (CDDP) and when combined with etoposide (VP-16). **a** c-Myc Knockdown (KD) confirmation by RT-PCR and b-actin used as internal control. **b** Representative image of the aspect of c-Myc KD cells compared to Wt and Ctl KD. Scale bar: 100 μ m. **c** c-

Myc KD cells proliferation, after 5 days of treatment with CDDP 25 μ M, VP-16 34 μ M or the combination was estimated by cumulative population doubling (CPD). **d** Relative end CPD (RendCPD) indicates the proliferation capacity. **e** Relative Time to Cross a Threshold (RTCT) was performed to observe if the treatment was able to delay the cell regrowth, while **f** Relative Proliferation Rate (RPR) parameter describes the relative regrowth velocity of the remaining cells. Results represent the mean (\pm SEM); a = $p < 0.05$; b = $p \leq 0.01$ in relation to non-treated cells. ** = $p \leq 0.01$.

Nanog knockdown strongly sensitized cells to cisplatin treatment

The efficacy of knocking down Nanog in P19 cells was confirmed by RT-PCR (Fig. 5a), and these cells presented more epidermal-like features, as seen in Fig. 5b, wherein some colonies were less compact and other cells were larger and flatter than Wt cells. Over the course of 30 days, Nanog KD cells were completely eliminated by CDDP. VP-16 treatment had little effect on their proliferation (Fig. 5c and d), despite the fact that both slowed the regrowth, as observed in RTCT analysis (Fig. 5e). Surprisingly, CDDP plus VP-16 treated cells responded in a very similar fashion as CP-16 alone (Fig. 5f).

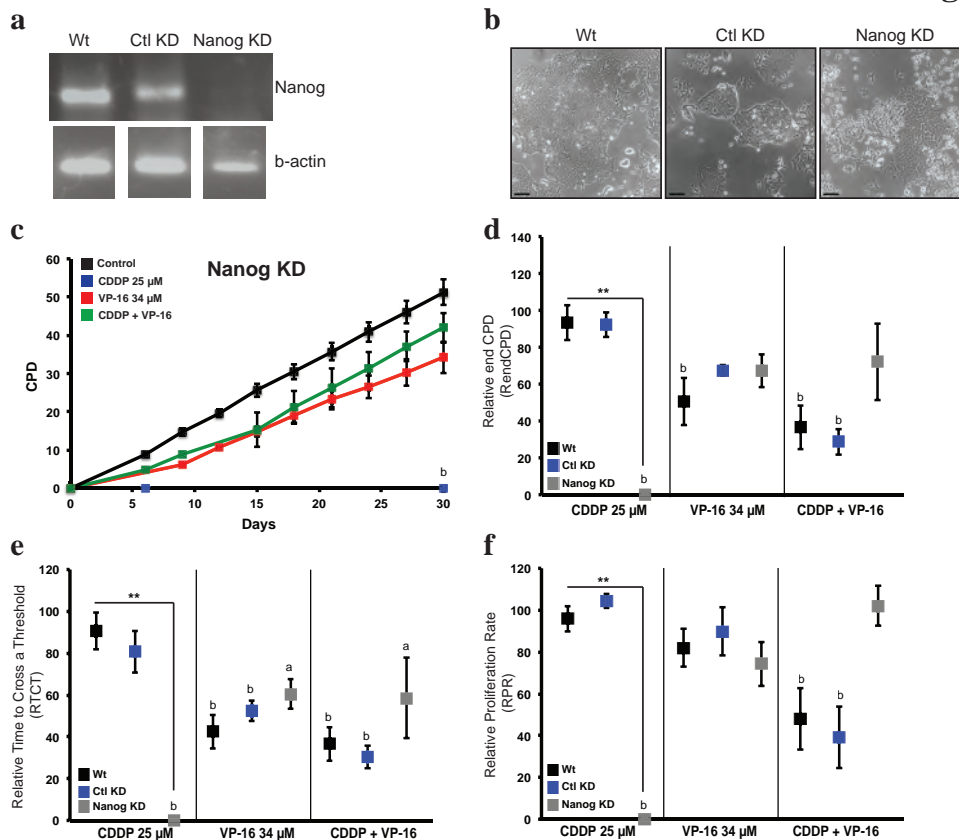
Fig. 5

Fig. 5. Nanog knockdown (KD) cells are sensitive to cisplatin (CDDP) but not with etoposide (VP-16). **a** Nanog silencing was confirmed by RT-PCR and b-actin used as internal control. **b** Representative image of the aspect of Sox2 KD cells compared to Wt and Ctl KD. Scale bar: 100 μ m. **c** Nanog KD cell proliferation was estimated by cumulative population doubling (CPD) after treatment with CDDP 25 μ M, VP-16 34 μ M or combination for 5 days **d** RendCPD (Relative end CPD) indicates the proliferation capacity at the last day analysis. **e** RTCT (Relative Time to Cross a Threshold) was performed to observe if the treatment was able to delay the cell regrowth, while **f** RPR (Relative Proliferation Rate) parameter describes the relative regrowth velocity of the remaining cells. Results represent the mean (\pm SEM); a = $p < 0.05$; b = $p \leq 0.01$ in relation to non-treated cells. ** = $p \leq 0.01$.

Discussion

TGCT is one of the most curable tumors, even when widely propagated. The combination of cisplatin with etoposide and bleomycin has been considered the gold standard, since 90

to 95 % of patients are cured (19). However, a small proportion of patients present resistance to the therapy, and this mechanism is not fully understood (20). It has been suggested that resistance to CDDP, specifically in TGCT, may occur due to: (i) reduction in the expression of OCT4; (ii) failure in the induction of pro-apoptotic proteins; (iii) changes in the expression of certain miRNAs; (iv) increasing levels of MDM2 and cytoplasmic translocation of p21 via phosphorylation; and (v) activation of PDGFRb / PI3K / pAKT pathway (21). Regarding VP-16, resistance can occur due to reduction in the expression of topoisomerase II or in genes involved in mismatch repair, but mainly due to the presence of P-glycoprotein, and ABC transporter encoded by MDR1 (multidrug resistance 1 gene) that transport cytotoxic drugs out of cell (22,23).

We observed that both control cells (Wt and Ctl KD) were resistant to CDDP 25 μ M, which is in agreement with primary teratocarcinoma-derived cells, wherein cells were described to be resistant to CDDP 30 μ M (3). However, only 5 μ M of CDDP was sufficient to reduce proliferation of F9 teratocarcinoma cells (24). This discrepancy can be explained since P19 and F9 cells appear to represent different stages of development because of the cell type they present, in which P19 cells resemble epiblast, while F9 cells are similar to the cells that form extraembryonic endoderm (25).

Oct4 is the main transcription factor to generate induced pluripotent cells (iPSC) and can be used in TGCT as a specific marker, since it is highly expressed in carcinoma *in situ*, seminoma and embryonic carcinoma tumors, with more undifferentiated features; and absent expression in differentiated components of non-seminoma tumors (22). The clone that presented complete Oct4 silencing (Oct4#1) was significantly more sensitive to CDDP + VP-16 when compared to partial silencing of Oct4 (Oct4#2a) indicating that different levels of silencing may have opposing effects on the sensitivity to this combined therapy.

The same was observed in other TGCT cell lines, wherein tumors expressing low levels of Oct4 correlated with induction of cisplatin resistance and poor prognosis in patients (26,27). Some of Oct4 pseudogenes (Oct4-pg1, pg3 and pg4) have a high sequence homology to Oct4A, and were shown to be transcribed, producing proteins that share the unique N-terminal coding sequence and similar protein size, thus potentially being able to have at least some of the functions of Oct4 (28). Furthermore, the antibody used to confirm the silencing can also potentially detect the pseudogenes. Thus, the putative presence of an Oct4 isoform with lower MW may perform some of the functions of Oct4 related to sensitivity.

Resistance to therapy is frequently observed in tumors and different pathways are activated aiming to correct the damage generated and allow cells to return to proliferate. Sox2 is a transcription factor member of the SOX gene family and the main characteristic of this family is the presence of a high mobility group domain (HMG) (29). This gene is involved in the maintenance and/or proliferation of ESCs and neural stem cells, being highly dependent on its expression levels (30–32). Sox2 is activated and involved in breast, ovarian and glioma resistance (33–35). However, the opposite effect is seen in TCGT, wherein the sensitivity correlates with increasing cells expressing proteins containing the HMG domain, such as SOX2, wherein it recognizes intrastrand cross-links caused by cisplatin and binds to them, inhibiting NER (nucleotide excision repair) (22). Our results showed that Sox2 KD did not further sensitize cells to VP-16 alone or combined to CDDP when compared to Wt cells. CDDP treatment alone showed no difference to control cells (Wt and Ctl KD). And similar to our results was observed in adenoid cystic carcinoma cells and head and neck squamous cell carcinoma, wherein cisplatin sensitivity was little or absent after silencing Sox2 (36,37).

Klf4 is capable of promoting the self-renewal of ESCs by activating several genes, such as Nanog, Oct4 and Sox2 (38,39). Klf4 KD cells treated with CDDP have a higher sensitivity

than Wt and Ctl KD cells. Our results were similar to observed in other types of tumors, wherein Klf4 levels negatively regulated the sensitivity of cancer cells to cisplatin in breast cancer, hepatocarcinoma and osteosarcoma (40–42). Absence of Klf4 increased proliferation in fibroblasts, and our results showed that teratocarcinoma cells with reduced expression presented approximately 20 % more proliferation than Wt cells (58).

c-Myc is an important proto-oncogene that regulates several genes involved in various cellular processes, and loss of its expression reduces cell growth and promotes differentiation, besides sensitizes cells to DNA damage (43–46). Different resistant tumors show high expression of c-Myc and the combination of chemotherapy with c-Myc silencing resulted in increased sensitivity, as observed in head and neck cancer, leukemia and gastric cancer (47–49). We observed similar results with association of cisplatin and c-Myc KD. However, combination of c-Myc silencing with CDDP plus VP-16 presented a better result, wherein cells were completely eliminated, probably due to the different forms of action of these drugs.

In TGCT, Nanog presents similar expression profile as Oct4 (22,50). Nanog overexpression resulted in resistance to cisplatin and other drugs in several types of cancers, such as esophageal, head and neck carcinoma, breast and ovary (51–54). Also, it regulates the expression of genes associated with resistance, as ABCB1 (ABC family members) and MDR1 (51,55). Nanog KD had the most potent sensitizing effect to cisplatin among the TFs analyzed in the present study. A similar result was observed in esophageal cancer, in which combination of shNanog and CDDP reduced proliferation rates, induced apoptosis and also decreased the expression of MDR1 (56,57). Treatment of human ESCs with etoposide induced apoptosis dependent of p53 and reduced Nanog expression (58). However, we observed resistant to etoposide alone or in combination with cisplatin in

teratocarcinoma cells silenced for Nanog, even compared to control cells with the same treatment. Several studies also observed the same antagonistic effect when CDDP and VP-16 were combined in endometrial carcinoma, ovarian carcinoma and lung (59–61). In fact, both synergism and antagonism effect can be observed when etoposide and cisplatin were combined. The result depended not only of the sequence of drug exposure but also the dosage used (59,60).

Taken together, combination of CDDP with Klf4, c-Myc and Nanog silencing presented better results compared to Wt, showing decreased resistance (Fig. 6a); while KD cells treated with VP-16 alone presented results similar to control (Fig. 6b). Moreover, combination of CDDP and VP-16 with different KD (Oct4#1, Sox2, Klf4 and c-Myc) increased even more the sensitivity compared to Wt cells (Fig. 6c).

Fig. 6

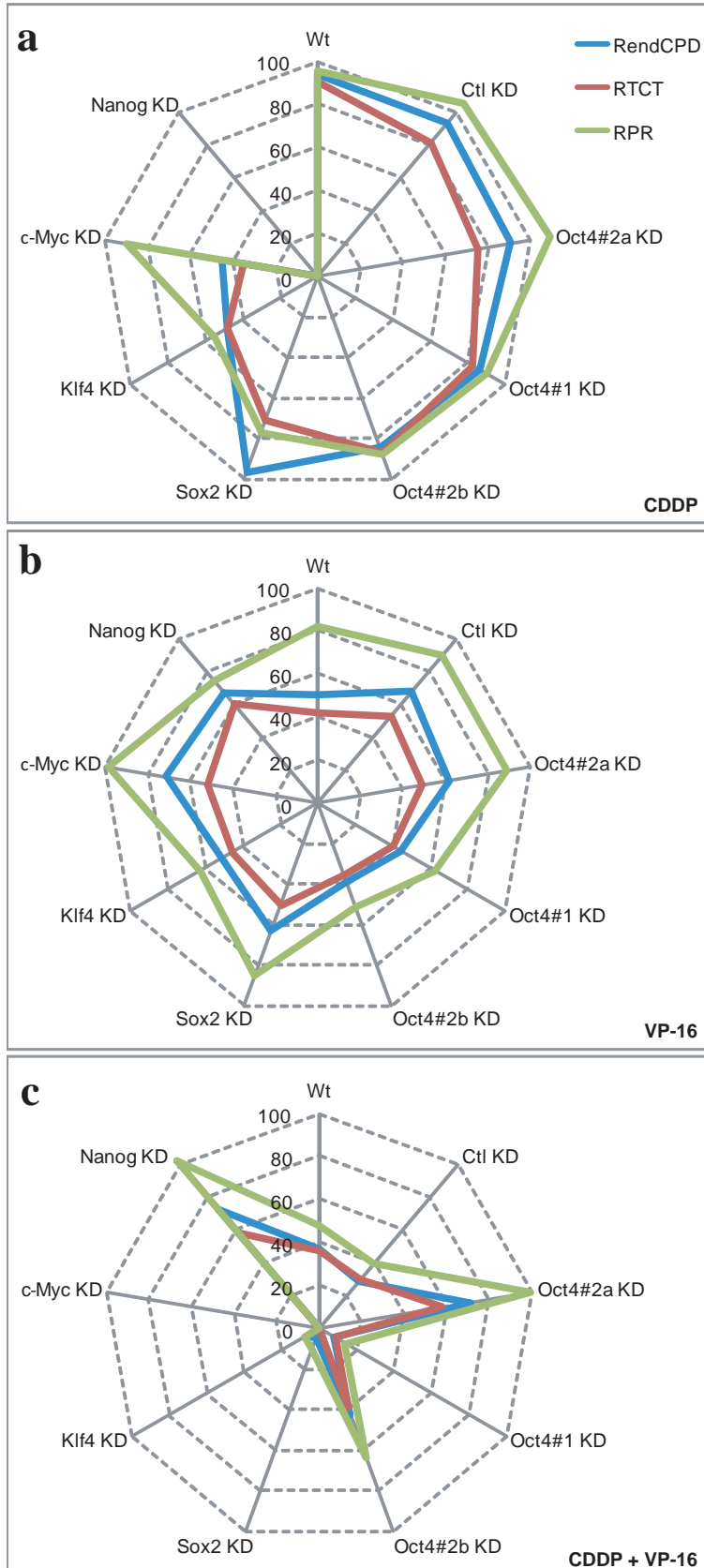


Fig. 6. Evaluation of control and all knockdown (KD) cells with CPD parameters. Comparison of RendCPD (Relative end CPD), RTCT (Relative Time to Cross a Threshold) and RPR (Relative Proliferation Rate) when **a** cisplatin (CDDP), **b** etoposide (VP-16) or **c** CDDP + VP-16 and KD cells were combined.

In conclusion, combining cisplatin and etoposide with KD of some but not all pluripotent genes potentiates the effects of chemotherapies *in vitro*. Furthermore, strategies to decrease expression of Klf4 or c-Myc may be beneficial in increasing the response of cisplatin or the combination of cisplatin plus etoposide.

5. Funding

This work was financially supported by Programa Binacional de Terapia Celular of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROBITEC/CAPES) 907/2012.

6. Conflicts of interest

All authors disclose no conflicts of interest.

7. References

1. Zamble D.B., Mikata Y., Eng C.H., Sandman K.E., Lippard S.J. 2002. Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *J Inorg Biochem.* 91:451–462.
2. Mardiak J., Šálek T., Syčová-Milá Z., Obertová J., Rečková M., Mego M., et al. 2007. Paclitaxel, bleomycin, etoposide, and cisplatin (T-BEP) as initial treatment in patients with poor-prognosis germ cell tumors (GCT): A phase II study. *Neoplasma.* 54:240–245.
3. Rennie A., Voigt W., Mueller T., Fruehauf A., Schmoll H.J., Beyer C., et al. 2005. Resistance mechanisms following cisplatin and oxaliplatin treatment of the human teratocarcinoma cell line 2102EP. *Anticancer Res.* 25:1147–1155.
4. Funato T., Kozawa K., Kaku M., Sasaki T. 2001. Modification of the sensitivity to cisplatin with c-myc over-expression or down-regulation in colon cancer cells. *Anticancer Drugs.* 12:829–834.

5. Prabhakaran P., Hassiotou F., Blancafort P., Filgueira L. 2013. Cisplatin induces differentiation of breast cancer cells. *Front. Oncol.* 3:1–10.
6. Sadowitz P.D., Hubbard B.A., Dabrowiak J.C., Goodisman J., Tacka K.A., Aktas M.K., et al. 2002 Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol-blocking agents and thiol drugs. *Drug. Metab. Dispos.* 30:183–190.
7. Khan A., Khan A.A., Dwivedi V., Ahmad M.G., Hakeem S., Owais M. 2007. The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Mol. Med.* 13:396–406.
8. Maswadeh H.M., Aljarbou A.N., Alorainy M.S., Alsharidah M.S., Khan M.A. 2015. Etoposide incorporated into camel milk phospholipids liposomes shows increased activity against fibrosarcoma in a mouse model. *Biomed. Res. Int.* 2015:1–11.
9. Clarke M.F., Fuller M. 2006. *Stem Cells and Cancer: Two Faces of Eve.* Cell. 124:1111–1115.
10. Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., et al. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 444:756–760.
11. Damjanov I. 2005. The road from teratocarcinoma to human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 1:273–276.
12. Isaacs H. 2013. 2013. Germ cell tumors. In: *Tumors of the fetus and infant.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 5–29.
13. Bustamante-Marín X., Garness J.A., Capel B. 2013. Testicular teratomas: an intersection of pluripotency, differentiation and cancer biology. *Int. J. Dev. Biol.* 57:201–210.
14. Chambers I., Smith A. 2004. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene.* 23:7150–7160.
15. Silva A.O., Felipe K.B., Villodre E.S., Lopez P.L.C., Lenz G. 2016. A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. *Tumor Biol.* 31:1–7.
16. Group I.W. 2002. Bleomycin, etoposide in combination with cisplatin and bleomycin - evaluation of carcinogenic risk to humans. *Pharmaceuticals.* Lyon (FR). Vol. 100
17. Hande K.R., Wedlund P.J., Wilkinson G.R., Noone R.M., Greco F.A., Wolff S.N. 1984. Pharmacokinetics of high-dose etoposide (VP-16-213) administered to cancer patients. *Cancer Res.* 44:379–382.
18. Yang Z., Schumaker L.M., Egorin M.J., Zuhowski E.G., Quo Z., Cullen K.J. 2006. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin. Cancer Res.* 12:5817–5825.
19. Huddart R.A., Birtle A.J. 2005. Recent advances in the treatment of testicular cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 5:123–138.
20. Koch S., Mayer F., Honecker F., Schittenhelm M., Bokemeyer C. 2003. Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro. *Br. J. Cancer.* 89:2133–2139.
21. Jacobsen C., Honecker F. 2015. Cisplatin resistance in germ cell tumours: models and mechanisms. *Andrology.* 3:111–121.
22. Giuliano C.J., Freemantle S.J., Spinella M.J. 2006. Testicular germ cell tumors: a paradigm for the successful treatment of solid tumor stem cells. *Curr. Cancer Ther. Rev.* 2:255–270.
23. Alpsyoy A., Yasa S., Gündüz U. 2014. Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer

- cell line is marked by multiple mechanisms. *Biomed. Pharmacother.* 68:351–355.
24. Doi T., Sumi T., Nishina Y., Kosaka M., Iwai S.A., Sakuda M., et al. 1995. Induction of teratocarcinoma F9 cell differentiation with cis-diammine dichloroplatinum(II) (CDDP). *Cancer Lett.* 88:81–86.
 25. Mallanna S.K., Boer B., Desler M., Rizzino A. 2008. Differential regulation of the Oct-3/4 gene in cell culture model systems that parallel different stages of mammalian development. *Mol. Reprod. Dev.* 75:1247–1257.
 26. Mueller T., Mueller L.P., Luetzkendorf J., Voigt W., Simon H., Schmoll H.-J. 2006. Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance. *Tumour Biol.* 27:71–83.
 27. Wu Y.C., Ling T.Y., Lu S.H., Kuo H.C., Ho H.N., Yeh S. D., et al. 2012. Chemotherapeutic sensitivity of testicular germ cell tumors under hypoxic conditions is negatively regulated by SENP1-controlled sumoylation of OCT4. *Cancer Res.* 72:4963–4973.
 28. Villodre E.S., Kipper F.C., Pereira M.B., Lenz G. 2016. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. *Cancer Treat. Rev.* 51:1–9.
 29. Ji J., Zheng P.S. 2010. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Hum. Pathol.* 41:1438–1447.
 30. Phi J.H., Park S.-H., Paek S.H., Kim S.-K., Lee Y.J., Park C.-K., et al. 2007. Expression of Sox2 in mature and immature teratomas of central nervous system. *Mod. Pathol.* 20:742–748.
 31. Kopp J.L., Ormsbee B.D., Desler M., Rizzino A. 2008. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells.* 26:903–911.
 32. Liu K., Lin B., Zhao M., Yang X., Chen M., Gao A., et al. 2013. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell Signal.* 25:1264–1271.
 33. Piva M., Domenici G., Iriondo O., Miriam R., Zabalza I., Kypta R., et al. 2014. Sox 2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol. Med.* 6:66–79.
 34. Li Y., Chen K., Li L., Li R., Zhang J., Ren W. 2015. Overexpression of SOX2 is involved in paclitaxel resistance of ovarian cancer via the PI3K/Akt pathway. *Tumor Biol.* 36:9823–9828.
 35. Garros-Regulez L., Aldaz P., Arrizabalaga O., Moncho-Amor V., Carrasco-Garcia E., Manterola L., et al. 2016. mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance. *Expert Opin. Ther. Targets.* 8222:393–405.
 36. Kobayashi Y., Sugiura T., Imajyo I., Shimoda M., Ishii K., Akimoto N., et al. 2014. Knockdown of the T-box transcription factor brachyury increases sensitivity of adenoid cystic carcinoma cells to chemotherapy and radiation in vitro: implications for a new therapeutic principle. *Int. J. Oncol.* 44:1107–1117.
 37. Lee S.H., Koo B.S., Kim J.M., Huang S., Rho Y.S., Bae W.J., et al. 2014. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *J. Pathol.* 111:2122–2130.
 38. Park C.S., Shen Y., Lewis A., Lacorazza H.D. 2016. Role of the reprogramming factor KLF4 in blood formation. *J. Leukoc. Biol.* 99:673–685.
 39. Aksoy I., Giudice V., Delahaye E., Wianny F., Aubry M., Mure M., et al. 2014. Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat. Commun.* 5:1–15.
 40. Jia Y., Zhang W., Liu H., Peng L., Yang Z., Lou J. 2012. Inhibition of glutathione

- synthesis reverses Krüppel-like factor 4-mediated cisplatin resistance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 69:377–385.
41. Jia Y., Zhang C., Zhou L., Xu H., Shi Y., Tong Z. 2015. Micheliolide overcomes KLF4-mediated cisplatin resistance in breast cancer cells by downregulating glutathione. *Onco. Targets Ther.* 8:2319–2327.
 42. Huang J., Liu K., Song D., Ding M., Wang J., Jin Q., et al. 2016. Kruppel-like factor 4 promotes high-mobility group box 1-induced chemotherapy resistance in osteosarcoma cells. *Cancer Sci.* 107:242–249.
 43. Elend M., Eilers M. 1999. Cell growth: downstream of Myc - To grow or to cycle? *Curr. Biol.* 9:936–938.
 44. Morton J.P., Sansom O.J. 2013. MYC-y mice: from tumour initiation to therapeutic targeting of endogenous MYC. *Mol. Oncol.* 7:248–258.
 45. Ott G. 2014. Impact of MYC on malignant behavior. *Hematology.* 2014:100–106.
 46. Petrich A.M., Nabhan C., Smith S.M. 2014. MYC-associated and double-hit lymphomas: a review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches. *Cancer.* 120:3884–3895.
 47. Xu J., Chen Y., Olopade O.I. 2010. MYC and breast cancer. *Genes Cancer.* 1:629–640.
 48. Pan X.N., Chen J.J., Wang L.X., Xiao R.Z., Liu L.L., Fang Z.G., et al. 2014. Inhibition of c-Myc overcomes cytotoxic drug resistance in acute myeloid leukemia cells by promoting differentiation. *PLoS One.* 9:e105381.
 49. Yang X., Cai H., Liang Y., Chen L., Wang X., Si R., et al. 2015. Inhibition of c-Myc by let-7b mimic reverses multidrug resistance in gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* 33:1723–1730.
 50. Hart A.H., Hartley L., Parker K., Ibrahim M., Looijenga L.H.J., Pauchnik M., et al. 2005. The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer.* 104:2092–2098.
 51. Wang M.-L., Chiou S.-H., Wu C.-W. 2013. Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *Onco. Targets Ther.* 6:1207–1220.
 52. Huang C.E., Yu C.C., Hu F.W., Chou M.Y., Tsai L.L. 2014. Enhanced chemosensitivity by targeting Nanog in head and neck squamous cell carcinomas. *Int. J. Mol. Sci.* 15:14935–14948.
 53. Liu S., Sun J., Cai B., Xi X., Yang L., Zhang Z., et al. 2016. NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance through activation of the STAT3 pathway in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biol.* 37:9671–9680.
 54. Arif K., Hussain I., Rea C., El-Sheemy M. 2015. The role of nanog expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Onco. Targets Ther.* 8:1327–1334.
 55. Zhou J.J., Deng X.G., He X.Y., Zhou Y., Yu M., Gao W.C., et al. 2014. Knockdown of NANOG enhances chemosensitivity of liver cancer cells to doxorubicin by reducing MDR1 expression. *Int. J. Oncol.* 45:2034–2040.
 56. Du Y., Shi L., Wang T., Liu Z., Wang Z. 2012. Nanog siRNA plus cisplatin may enhance the sensitivity of chemotherapy in esophageal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138:1759–1767.
 57. Yang L., Zhang X., Zhang M., Zhang J., Sheng Y., Sun X., et al. 2012. Increased Nanog expression promotes tumor development and cisplatin resistance in human esophageal cancer cells. *Cell Physiol. Biochem.* 30:943–952.
 58. Grandela C., Pera M.F., Wolvetang E.J. 2008. P53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 1:116–128.

59. Adel A.L., Dorr R.T., Ph D., Liddil J.D. 1993. The effect of anticancer drug sequence in experimental combination chemotherapy. *Cancer Invest.* 11:15–24.
60. Tsai C.M., Gazdar A.F., Venzon D.J., Steinberg S.M., Dedrick R.L., Mulshine J.L., et al. 1989. Lack of in vitro synergy between etoposide and cis-diammine-dichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 49:2390–2397.
61. Katz E.J., Vick J.S., Kling K.M., Andrews P.A., Howell S.B. 1990. Effect of topoisomerase modulators on cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 26:724–727.

Supplementary Table I

Supplementary Table I. Identity of the shRNA clones used.

Gene	Gene ID	Clone ID	Cell line name
Oct4	18999	NM_013633.1-659s1c1	Oct4#1 KD
		NM_013633.1-544s1c1	Oct4#2a KD
			Oct4#2b KD
Klf4	16600	NM_004235.3-1716s1c1	Klf4 KD
Sox2	20674	NM_003106.2-1060s21c1	Sox2 KD
Nanog	71950	XM_132755.3-122s1c1	Nanog KD
c-Myc	17869	NM_002467.4-952s21c1	Myc KD
GFP	-	SHC005	Ctl KD

DISCUSSÃO

iPSC apresentam um grande potencial para a medicina regenerativa e também quanto as questões éticas devido ao uso de células derivadas de embriões. Entretanto, o potencial tumorigênico é considerado o principal impedimento para o seu uso [214]. Uma reprogramação celular eficaz necessita que a expressão dos TFs seja transitória, uma vez que a manutenção da expressão desses fatores, principalmente c-MYC, em uma pequena subpopulação de células parece ser a origem desse potencial [215]. Contudo, o risco de formação de teratomas diminui com a diferenciação das células pluripotentes [32,216].

Teratocarcinomas derivam de TCGT malignos e são compostos pela mistura de teratomas com células de carcinoma embrionário. Células de teratocarcinoma murino P19 são um ótimo modelo para estudo da regulação da tumorigenicidade, de iPSC e de diferenciação celular, uma vez que essa linhagem é composta pelas ECCs, consideradas a versão maligna das ESCs, que podem originar células derivadas dos três folhetos embrionários [24].

O padrão ouro de tratamento para TGCT consiste na combinação de cisplatina (CDDP) com etoposídeo (VP-16) e bleomicina, em que 90 a 95 % dos pacientes são curados [217]. No entanto, uma pequena proporção apresenta resistência à terapia e o seu mecanismo ainda não está totalmente compreendido [218]. Diversos fatores estão envolvidos na resistência à CDDP, mas, especificamente em TGCT, algumas vias já foram descritas, como redução na expressão de OCT4 e falha na indução de proteínas pró-apoptóticas [22]. Resistência ao VP-16 também já foi descrita e pode ocorrer devido alterações na expressão ou atividade da topoisomerase II, em genes da via de reparo por MMR, mas principalmente devido à expressão da glicoproteína-P [3,31].

No presente trabalho, apresentamos no capítulo I uma revisão sobre o fator de transcrição OCT4. Esse gene é um dos TFs mais importantes para a manutenção da pluripotência e está envolvido em diversas vias, além de ser altamente regulado. No capítulo II e III apresentamos os dados obtidos na investigação entre a associação dos diferentes TFs responsáveis pela pluripotência (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC e NANOG) com a capacidade de formação de teratomas *in vivo* e a

sua influência na sensibilidade das células após o tratamento com CDDP e VP-16 *in vitro*.

Células selvagem (Wt) e controle do silenciamento (Ctl KD) foram resistentes à CDDP 25 μ M (Capítulo III – Fig. 1c e 1d). Semelhante aos nossos resultados, observou-se células de tumor primário de teratocarcinoma resistentes mesmo com o tratamento com 30 μ M [16]. No entanto, em células de teratocarcinoma F9, apenas 5 μ M de CDDP foi suficiente para reduzir a proliferação e induzir diferenciação [24]. Esta divergência pode ser explicada uma vez que células P19 e F9 representam diferentes estágios do desenvolvimento devido ao tipo de célula que elas apresentam; em que células P19 assemelham-se ao epiblasto, enquanto as células F9 são semelhantes as que formam endoderme extraembrionária [219].

Interessantemente, parece que a maioria dos tumores que apresentaram mais células indiferenciadas ou ectoderme primitiva foram mais sensíveis ao tratamento com VP-16 do que os que apresentaram maior grau de diferenciação ao compararmos resultados *in vivo* (Capítulo II) com *in vitro* (Capítulo III) . Nossos resultados foram compatíveis com o já observado em outras células derivadas de teratomas tratados com etoposídeo, em que houve redução dos componentes imaturos, sobretudo de tecido neuroepitelial, principal componente de teratomas e que apresenta altos índices proliferativos; enquanto que tecidos com características mais diferenciadas permanecem inalterados [28]. Assim, essa droga exerce o seu efeito principalmente sobre teratomas que apresentam grandes áreas de tecido indiferenciado e com elevada taxa de proliferação, ao invés dos tecidos diferenciados [28]. Interessantemente, a implantação de células cardíacas pré-diferenciadas, derivadas de iPSC de rato tratados com etoposídeo, reduziu a formação de teratoma, uma vez que aboliu as células indiferenciadas remanescentes [32].

No presente trabalho, realizamos o silenciamento, via shRNA, de OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC e NANOG em células P19 com o intuito de avaliar a importância desses fatores na formação e resistência ao tratamento em teratomas. Para o silenciamento utilizou-se vetores lentivirais para obter linhagens estáveis com expressão reduzida ou ausente desses genes. Essa técnica é bastante empregada para esse fim e a utilização desse tipo de vetor permite

fornecer uma quantidade significativa de RNA viral para o DNA da célula hospedeira, além da capacidade única de infectar células que não se dividem, sendo assim, um dos métodos mais eficientes [149]. Também é uma técnica altamente específica e eficiente, atuando na degradação de RNA mensageiro, assim inibindo a síntese proteica e afetando a atuação do gene alvo [152]. Além disso, como o silenciamento via lentivírus é estável e selecionam-se as células que receberam o plasmídeo, células silenciada por um determinado tempo são capazes de se adaptar à falta daquele gene, além de células em que a deleção foi grande demais também podem ser eliminadas durante a seleção [227].

Dentre todos os TFs relacionados com pluripotência, OCT4 é o mais importante, considerando que a sua ausência ou redução induz diferenciação celular, além de diferentes níveis de OCT4 podem controlar o potencial oncogênico de ESCs, em que maior expressão correlaciona com um tumor mais maligno [36,38]. Além disso, é o principal TF para gerar iPSC e pode ser usado como um marcador específico em TGCT, pois está altamente expresso nos tumores carcinoma *in situ*, seminoma e carcinoma embrionário, que apresentam características mais indiferenciados; além de estar reduzido ou ausente em componentes diferenciados dos tumores tipo não-seminoma [3].

Em relação à expressão de OCT4 e resistência, estudos mostram que alta expressão desse gene está correlacionado com aumento da resistência e pior prognóstico para pacientes (Capítulo I – Tabelas 2 e 3). Entretanto, TCGT é a exceção, em que tratamento com cisplatina reduz a expressão e aumenta a resistência; e a alta expressão correlaciona com melhor prognóstico (Capítulo I – Tabela 2) [51–53].

Para o silenciamento de OCT4, utilizamos duas sequências diferentes de shRNA (Capítulo III – Tabela Suplementar I), sendo que a segunda sequência gerou dois clones com diferente expressão de OCT4 (Capítulo III – Fig. 1a). Células OCT4#2a apresentaram uma redução da expressão (Capítulo III – Fig. 1a), e, *in vivo*, apresentaram não só células indiferenciadas, mas também diferenciadas em cérebro maduro, cartilagem e glândula (Capítulo II – Fig. 1d). Além disso, essas células foram resistentes a todos os tratamentos, CDDP e VP-16 sozinhos ou em combinação (Capítulo III – Fig. 1e). As duas linhagens

silenciadas que apresentam redução praticamente completa da expressão de OCT4, OCT4#1 e OCT4#2b, foram resistentes apenas à CDDP (Capítulo III – Fig. 1f e 1g). O mesmo foi observado em outras linhagens de células TCGT, em que tumores que expressam baixos níveis de OCT4 correlacionaram com a indução de resistência à cisplatina e pior prognóstico em pacientes [51,52]. Interessantemente, OCT4#1 e OCT4#2b comportaram-se de maneira diferente *in vivo*; o primeiro apenas apresentou tecidos indiferenciados e ectoderme, enquanto que OCT4#2b apresentou células derivadas de todas as camadas germinativas (Capítulo II – Fig. 1c e 1e). Esta diferença pode ser devido a presença do pseudogene de OCT4 no clone OCT4#2b. O anticorpo utilizado para confirmar o silenciamento, sc-5279 (marca Santa Cruz), foi produzido contra a sequência N-terminal da proteína, presentes apenas na isoforma OCT4A (Capítulo I – Fig. 1); no entanto, alguns dos pseudogenes de OCT4 (OCT4-pg1, pg3 e pg4) são altamente homólogos ao OCT4A e compartilham a sequência N-terminal [220]. Portanto, o anticorpo para OCT4 utilizado neste estudo também pode detectar alguns dos seus pseudogenes, e a presença de uma menor banda em OCT4#2b, e fracamente presente em Wt e Ctl KD (Capítulo III – Fig. 1a), pode ser a presença da expressão do pseudogene. Além disso, pseudogenes podem atuar como reguladores de OCT4, tal como esponjas de miRNA protegendo o transcrito de OCT4 de ser inibido pelos miRNA (Capítulo I).

SOX2 é TF membro da família SOX e a principal característica desta família é a presença de um domínio de alta mobilidade (HMG) [87]. Esse gene está envolvido na manutenção e/ou na proliferação de ESCs, e está expresso nas células de neuroepitélio primitivas em teratomas imaturos do sistema nervoso central; entretanto, limita-se ao epitélio com origem endodérmica nos teratomas maduros [96,97]. Em nosso estudo, células SOX2 KD apresentaram células derivadas da ectoderme e mesoderme, e somente uma amostra apresentou endoderme (Capítulo II - Fig. 1f). A maior diferença desse silenciamento em relação aos demais foi a quantidade de área necrótica presente nos teratomas de SOX2 KD, em que quase 50 % do tumor era composto de necrose.

Resistência à terapia é comumente observada em tumores e diversas vias são ativadas com o intuito de corrigir o dano gerado e voltar a proliferar. Um dos

genes que está ativado e envolvido com resistência de mama, ovário e glioma é SOX2 [112–114]. Entretanto, efeito oposto é visto em TCGT, em que a sensibilidade correlaciona com o aumento da expressão de células contendo o domínio HMG, como SOX2. Esse domínio reconhece ligações cruzadas intracadeia causadas pela cisplatina e liga-se a eles inibindo a ação do reparo via NER [3]. Nossos resultados mostraram que as células SOX2 KD foram sensíveis ao VP-16, sozinho ou combinado com CDDP em comparação com não-tratados (Capítulo III - Fig. 2c). No entanto, somente o tratamento com CDDP o resultado foi bastante semelhante às células controles (Wt e Ctl KD), enquanto que com o tratamento combinado as células foram mais sensíveis (Capítulo III - Fig. 2d) e diminuiu fortemente a velocidade de crescimento (Capítulo III - Fig. 2e). Resultados semelhantes foram vistos em células de carcinoma adenóide cístico e carcinoma células escamosas de cabeça e pescoço, em que a sensibilidade a cisplatina foi pouca ou ausente depois de silenciá-lo [221,222].

KLF4 é capaz de promover a autorrenovação de ESCs por ativar diversos genes, como NANOG, OCT4 e SOX2; e a sua expressão está envolvida no comprometimento de células pluripotentes a diferenciação endodérmica [65,66]. Nossos resultados *in vivo* com células silenciadas para KLF4 foram divergentes em relação ao tipo de célula formada, em que observou-se a presença de células indiferenciadas, ectoderme e mesoderme (Capítulo II - Fig. 1g). Este resultado pode ser explicado pois não foi obtido um silenciamento completo (Capítulo III - Fig. 3a) e as células que ainda expressam podem estar evitando a diferenciação endodérmica.

Células KLF4 KD tratadas com CDDP apresentaram maior sensibilidade do que as células Wt e Ctl KD tratados (Capítulo III - Fig. 3c). Os resultados foram semelhantes aos observados em câncer da mama, carcinoma hepatocelular e osteosarcoma, em que os níveis de KLF4 regulam negativamente a sensibilidade das células cancerosas à cisplatina [76,78,79]. Além disso, VP-16, isoladamente, apresentou resultados semelhantes à CDDP, mas combinando as duas drogas houve acentuada redução na taxa de proliferação (Capítulo III - Fig. 3c).

O aumento da proliferação devido a ausência de KLF4 já foi descrito em fibroblastos e observamos nas células de teratocarcinoma um aumento de 20 %

da proliferação comparado as células Wt (Capítulo III - Fig. 1c e Fig. 3c) [55]. Interessantemente, as células KLF4 KD foram as únicas a aumentar a sensibilidade para todos os tratamentos (Capítulo III - Fig. 3c). Assim, o aumento na proliferação pode explicar o efeito que os tratamentos tiveram sobre as células silenciadas; ou seja, cisplatina e etoposídeo, que atuam em diferentes vias, podem atuar melhor por ter mais células em processo de divisão [27].

c-MYC é um importante proto-oncogene que regula diversos genes envolvidos em vários processos celulares, além de ser utilizado para aumentar a eficiência na formação das iPSC [162,164,168,212]. A perda da expressão reduz o crescimento celular e promove a diferenciação, além de sensibilizar as células a danos no DNA [162,169]. Em ESCs de camundongo, a ausência diminui o potencial de autorrenovação e induziu a diferenciação precoce para células das três camadas germinativas embrionárias, porém nenhuma célula totalmente diferenciada foi observada [223]. Semelhante, em câncer de cólon, a presença de c-MYC correlaciona com tumores mais indiferenciados e proliferativos [184]. Nos tumores derivados de células c-MYC KD observamos a presença de células indiferenciadas, entretanto a maioria do tecido foi composto principalmente de neuroectoderme primitiva e endoderme (Capítulo II - Fig. 1h).

Histologicamente, tumores podem ser classificados por grau que indica o quão proliferativo esse tumor pode ser. Essa descrição tem como base a morfologia e aparência do tecido tumoral a partir de uma biópsia corada com hematoxilina-eosina (H&E). Grau 1 (baixo grau), normalmente denominado “bem diferenciado”, são tumores que apresentam alta semelhança com as células do tecido de origem e, normalmente, crescem de forma mais lenta que os demais graus. Conforme a semelhança com o tecido de origem não é encontrada e mais células anormais ou com características diferenciadas, maior é o grau tumoral. Tumores de grau II (grau intermediário) são denominados “moderadamente diferenciado”. E tumores de alto grau, III e IV, denominados “pouco diferenciado” ou “indiferenciado”, respectivamente, apresentam alta proliferação e espalham-se mais rápido (<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/prognosis/tumor-grade-fact-sheet> acesso: out/2016). Entretanto essa classificação baseia-se somente pelas características histológicas e não nas vias moleculares ativadas que podem

interferir no tratamento. E um trabalho de 2008 mostrou, pela primeira vez, a correlação entre grau tumoral e presença de CSCs, na qual tumores de grau III e IV apresentaram alta expressão de NANOG, OCT4, SOX2 e c-MYC [224]. Genes responsáveis pela pluripotência como NANOG, OCT4 e SOX2 precisam ser finamente regulados e c-MYC aparenta ser, tanto em ESCs quanto em CSCs, um dos principais reguladores [202].

Diferentes tumores resistentes apresentam elevada expressão de c-MYC, e a combinação de drogas quimioterápicas com o seu silenciamento resultou no aumento da sensibilidade de diversos cânceres, como de cabeça e pescoço, leucemia e câncer gástrico [185–187]. Observamos resultados semelhantes ao associar tratamento com cisplatina e c-MYC KD (Capítulo III - Fig. 4c). No entanto, obtivemos um melhor resultado ao combinar o silenciamento com CDDP mais VP-16, uma vez que as células não foram capazes de proliferar (Capítulo III - Fig. 4d). O tratamento com apenas o etoposídeo não alterou a sensibilidade; na verdade, foram mais resistentes do que as células controle que também receberam VP-16 (Capítulo III - Fig. 4d).

Em TCGT, NANOG apresenta um perfil de expressão semelhante à OCT4, sendo altamente expresso em tumores com características indiferenciadas, mas ausente ou baixo em componentes diferenciados de tumores do tipo não-seminoma; além de ser um dos responsáveis para evitar a diferenciação em endoderme nas ESCs [1,3,123,124]. Em nossos resultados *in vivo* não observamos formação de endoderme após a implantação de células sem expressão de NANOG, somente a presença de células indiferenciadas e neuroectoderme (Capítulo II - Fig. 1i).

Resistência à cisplatina e outras drogas devido à superexpressão de NANOG já foi descrito em vários tipos de cânceres, como esôfago, carcinoma de cabeça e pescoço, mama e ovário [127,156,158,159]. Além disso, NANOG regula a expressão de genes associados à resistência, ABCB1 e MDR1 [127,157]. Demonstramos no presente trabalho, que o tratamento com CDDP inibe a proliferação de células NANOG KD (Capítulo III - Fig. 5c), e, ao comparar todos os TFs analisados, apenas a ausência de NANOG foi capaz de aumentar a sensibilidade à cisplatina (Capítulo III - Fig. 6a). Resultados equivalentes foram

observado em câncer de esôfago, em que a combinação de silenciamento e CDDP reduziu as taxas de proliferação, induziu apoptose e diminuiu a expressão da MDR1 [225,226]. Tratamento de ESCs humanas com etoposídeo induziu apoptose dependente de p53 e reduziu a expressão de NANOG [29]. No entanto, células de teratocarcinoma silenciadas para Nanog foram resistentes a etoposídeo sozinho ou combinado com a cisplatina, mesmo em comparação com as células controle com o mesmo tratamento (Capítulo III - Fig. 5d), possivelmente o resultado controverso deu-se ao fato de que as ESCs, uma vez que são células normais, são mais sensíveis a drogas comparadas com células tumorais.

Assim, combinação de CDDP com o silenciamento de KLF4, c-MYC e NANOG exibiu melhores resultados em comparação com as células Wt, apresentando menor resistência (Capítulo III - Fig. 6a); enquanto que as células silenciadas tratadas com somente etoposídeo apresentaram resultados semelhantes ao controle (Capítulo III - Fig. 6b). Além disso, a combinação de cisplatina e etoposídeo com diferentes silenciamentos (OCT4#1, SOX2, KLF4 e c-MYC) aumentou ainda mais a sensibilidade em comparação com células Wt (Capítulo III - Fig. 6c).

PERSPECTIVAS

Realizar estudo *in vivo* com as células silenciadas juntamente com os tratamentos mais eficientes.

Silenciar dois ou mais fatores nas células de teratocarcinoma e caracterizar as células *in vivo*, além de analisar resposta ao tratamento *in vitro* e *in vivo*.

CONCLUSÕES

Nesse trabalho observamos que o silenciamento isolado dos fatores de transcrição não foi suficiente para impedir a formação de teratomas. E, a ausência / redução de OCT4 e SOX2 foi capaz de induzir tumores mais diferenciados, justamente os dois genes mais importantes para manter a célula com características pluripotentes.

Além disso, tratamento mais efetivo para TCGT foi a combinação das drogas, cisplatina e etoposídeo, com o silenciamento de genes de pluripotência, exceto para Nanog. E reduzir a expressão de KLF4 ou c-MYC pode ser uma estratégia para aumentar a sensibilidade à quimioterapia em TCGT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A.H. Hart, L. Hartley, K. Parker, M. Ibrahim, L.H.J. Looijenga, M. Pauchnik, C.W. Chow, L. Robb, The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors, **Cancer**. 104 (2005) 2092–2098.
- [2] R. Koster, M. a T.M. van Vugt, H. Timmer-Bosscha, J. a Gietema, S. de Jong, Unravelling mechanisms of cisplatin sensitivity and resistance in testicular cancer, **Expert Rev. Mol. Med.** 15 (2013) e12.
- [3] C.J. Giuliano, S.J. Freemantle, M.J. Spinella, Testicular germ cell tumors: a paradigm for the successful treatment of solid tumor stem cells, **Curr. Cancer Ther. Rev.** 2 (2006) 255–270.
- [4] X. Bustamante-Marín, J.A. Garness, B. Capel, Testicular teratomas: An intersection of pluripotency, differentiation and cancer biology, **Int. J. Dev. Biol.** 57 (2013) 201–210.
- [5] Y. Mizutani, N. Sato, A. Kawauchi, N. Nonomura, M. Fukushima, T. Miki, Cisplatin-induced in vivo differentiation of human embryonal carcinoma, **BJJ Int.** 89 (2002) 454–458.
- [6] I. Damjanov, The road from teratocarcinoma to human embryonic stem cells, **Stem Cell Rev.** 1 (2005) 273–276.
- [7] H. Isaacs, Germ Cell Tumors, in: Tumors of the Fetus and Infant, **Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg** (2013) 5–29.
- [8] I. Chambers, A. Smith, Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells, **Oncogene**. 23 (2004) 7150–7160.
- [9] M.W. McBurney, B.J. Rogers, Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns, **Dev. Biol.** 89 (1982) 503–508.
- [10] M.W. McBurney, P19 embryonal carcinoma cells, **Int. J. Dev. Biol.** 37 (1993) 135–140.
- [11] G. Bain, W.J. Ray, M. Yao, D.I. Gottlieb, From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway, **Bioessays**. 16 (1994) 343–348.
- [12] M.A.G. Van Der Heyden, L.H.K. Defize, Twenty one years of P19 cells: What an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation, **Cardiovasc. Res.** 58 (2003) 292–302.
- [13] L.Y. Wu, Y. Wang, B. Jin, T. Zhao, H.T. Wu, Y. Wu, M. Fan, X.M. Wang, L.L. Zhu, The role of hypoxia in the differentiation of P19 embryonal carcinoma cells into dopaminergic neurons, **Neurochem. Res.** 33 (2008) 2118–2125.
- [14] D.B. Zamble, Y. Mikata, C.H. Eng, K.E. Sandman, S.J. Lippard, Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin, **J. Inorg. Biochem.** 91 (2002) 451–462.
- [15] J. Mardiak, T. Šálek, Z. Syčová-Milá, J. Obertová, M. Rečková, M. Mego, Z. Hlavatá, K. Brozmanová, Z. Risnyovzská, D. Světlovská, I. Koza, Paclitaxel, bleomycin, etoposide, and cisplatin (T-BEP) as initial treatment in patients with poor-prognosis germ cell tumors (GCT): A phase II study, **Neoplasma**. 54 (2007) 240–245.
- [16] A. Rennie, W. Voigt, T. Mueller, A. Fruehauf, H.J. Schmoll, C. Beyer, W. Dempke, Resistance mechanisms following cisplatin and oxaliplatin treatment of the human teratocarcinoma cell line 2102EP, **Anticancer Res.**

- 25 (2005) 1147–1155.
- [17] T. Funato, K. Kozawa, M. Kaku, T. Sasaki, Modification of the sensitivity to cisplatin with c-myc over-expression or down-regulation in colon cancer cells, **Anticancer. Drugs**. 12 (2001) 829–834.
- [18] P. Prabhakaran, F. Hassiotou, P. Blancafort, L. Filgueira, Cisplatin induces differentiation of breast cancer cells, **Front. Oncol.** 3 (2013) 1-10.
- [19] C.R.R. Rocha, C.C.M. Garcia, D.B. Vieira, a Quinet, L.C. de Andrade-Lima, V. Munford, J.E. Belizário, C.F.M. Menck, Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo, **Cell Death Dis.** 5 (2014) e1505.
- [20] P.D. Sadowitz, B.A. Hubbard, J.C. Dabrowiak, J. Goodisman, K.A. Tacka, M.K. Aktas, M.J. Cunningham, R.L. Dubowy, A.K. Souid, Kinetics of cisplatin binding to cellular DNA and modulations by thiol-blocking agents and thiol drugs, **Drug Metab. Dispos.** 30 (2002) 183–190.
- [21] H. Timmer-Bosscha, D. Vries, C. Meijer, Differential effects of all-trans-retinoic acid, docosahexaenoic acid, and hexadecylphosphocholine on cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in a cisplatin-sensitive and resistant human embryonal carcinoma cell line, **Cancer Chemother Pharmacol.** 41 (1998) 469–476.
- [22] C. Jacobsen, F. Honecker, Cisplatin resistance in germ cell tumours: Models and mechanisms, **Andrology**. 3 (2015) 111–121.
- [23] I.A. Voutsadakis, The chemosensitivity of testicular germ cell tumors, **Cell. Oncol.** 37 (2014) 79–94.
- [24] T. Doi, T. Sumi, Y. Nishina, M. Kosaka, S.A. Iwai, M. Sakuda, Y. Nishimune, Induction of teratocarcinoma F9 cell differentiation with cis-diammine dichloroplatinum(II) (CDDP), **Cancer Lett.** 88 (1995) 81–86.
- [25] M.T. Parodi, L. Varesio, G.P. Tonini, Morphological change and cellular differentiation induced by cisplatin in human neuroblastoma cell lines, **Cancer Chemother Pharmacol.** 25 (1989) 114–116.
- [26] A. Khan, A.A. Khan, V. Dwivedi, M.G. Ahmad, S. Hakeem, M. Owais, The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer, **Mol. Med.** 13 (2007) 396–406.
- [27] H.M. Maswadeh, A.N. Aljarbou, M.S. Alorainy, M.S. Alsharidah, M.A. Khan, Etoposide incorporated into camel milk phospholipids liposomes shows increased activity against fibrosarcoma in a mouse model, **Biomed Res. Int.** 2015 (2015) 1-11.
- [28] J. Sundström, L.J. Pelliniemi, E. Salminen, P. Pöllänen, E. Abdelwahid, E. Veräjänkorva, K. Söderström, Effect of etoposide on experimental testicular teratoma in 129/SvJ mice, **Virchows Arch.** 436 (2000) 608–616.
- [29] C. Grandela, M.F. Pera, E.J. Wolvetang, P53 is required for etoposide-induced apoptosis of human embryonic stem cells, **Stem Cell Res.** 1 (2008) 116–128.
- [30] D. Wang, Q. Zhu, X. Zhang, L. Zhang, Q. He, B. Yang, Hypoxia promotes etoposide (VP-16) resistance in neuroblastoma CHP126 cells, **Pharmazie**. 65 (2010) 51–56.
- [31] A. Alpsyoy, S. Yasa, U. Gündüz, Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer cell line is marked by multiple mechanisms, **Biomed. Pharmacother.** 68 (2014) 351–355.

- [32] S.P. Wyles, S. Yamada, S. Oommen, J.J. Maleszewski, R. Beraldi, A. Martinez-Fernandez, A. Terzic, T.J. Nelson, Inhibition of DNA topoisomerase II selectively reduces the threat of tumorigenicity following induced pluripotent stem cell-based myocardial therapy, **Stem Cells Dev.** 23 (2014) 1–27.
- [33] J.-P. Cosse, M. Ronvaux, N. Ninane, M.J. Raes, C. Michiels, Hypoxia-induced decrease in p53 protein level and increase in c-jun DNA binding activity results in cancer cell resistance to etoposide, **Neoplasia.** 11 (2009) 976–986.
- [34] S. Latchman, Transcription factors : an overview, **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2725 (1997) 1305-1312.
- [35] G. Wu, H.R. Schöler, Role of Oct4 in the early embryo development, **Cell Regen.** 3 (2014) 1-10.
- [36] H. Niwa, J. Miyazaki, A.G. Smith, Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells, **Nat. Genet.** 24 (2000) 372–376.
- [37] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, **Cell.** 126 (2006) 663–676.
- [38] S. Gidekel, G. Pizov, Y. Bergman, E. Pikarsky, Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant, **Cancer Cell.** 4 (2003) 361–370.
- [39] S. Zhao, Q. Yuan, H. Hao, Y. Guo, S. Liu, Y. Zhang, J. Wang, H. Liu, F. Wang, K. Liu, E.A. Ling, A. Hao, Expression of OCT4 pseudogenes in human tumours: Lessons from glioma and breast carcinoma, **J. Pathol.** 223 (2011) 672–682.
- [40] D. Pain, G.W. Chirn, C. Strassel, D.M. Kemp, Multiple retropseudogenes from pluripotent cell-specific gene expression indicates a potential signature for novel gene identification, **J. Biol. Chem.** 280 (2005) 6265–6268.
- [41] G. Suo, J. Han, X. Wang, J. Zhang, Y. Zhao, Y. Zhao, J. Dai, Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 337 (2005) 1047–1051.
- [42] X. Wang, J. Dai, Concise review: Isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology, **Stem Cells.** 28 (2010) 885–893.
- [43] Y. Atlasi, S.J. Mowla, S.A.M. Ziaee, P.J. Gokhale, P.W. Andrews, OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells, **Stem Cells.** 26 (2008) 3068–3074.
- [44] E.F. Yazd, M.R. Rafiee, M. Soleimani, M. Tavallaei, M.K. Salmani, S.J. Mowla, OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response, **Cancer Lett.** 309 (2011) 170–175.
- [45] Y. Gao, X. Wang, J. Han, Z. Xiao, B. Chen, G. Su, J. Dai, The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B, **J. Genet. Genomics.** 37 (2010) 461–465.
- [46] S.L. Palmieri, W. Peter, H. Hess, H.R. Schöler, Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation, **Dev. Biol.** 166 (1994) 259-267.
- [47] M. Pesce, X. Wang, D.J. Wolgemuth, H.R. Schöler, Differential expression

- of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation, **Mech. Dev.** 71 (1998) 89–98.
- [48] H.R. Scholer, G.R. Dressler, H. Rohdewohid, P. Gruss, Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex, **EMBO J.** 9 (1990) 2185–2195.
- [49] L. Shen, X. Huang, X. Xie, J. Su, J. Yuan, X. Chen, High Expression of SOX2 and OCT4 Indicates Radiation Resistance and an Independent Negative Prognosis in Cervical Squamous Cell Carcinoma., **J. Histochem. Cytochem.** 62 (2014) 499–509.
- [50] L.L. Tsai, C.C. Yu, Y.C. Chang, C.H. Yu, M.Y. Chou, Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma, **J. Oral Pathol. Med.** 40 (2011) 621–628.
- [51] Y.C. Wu, T.Y. Ling, S.H. Lu, H.C. Kuo, H.N. Ho, S. Der Yeh, C.N. Shen, Y.H. Huang, Chemotherapeutic sensitivity of testicular germ cell tumors under hypoxic conditions is negatively regulated by SENP1-controlled sumoylation of OCT4, **Cancer Res.** 72 (2012) 4963–4973.
- [52] T. Mueller, L.P. Mueller, J. Luetzkendorf, W. Voigt, H. Simon, H.-J. Schmoll, Loss of Oct-3/4 expression in embryonal carcinoma cells is associated with induction of cisplatin resistance, **Tumour Biol.** 27 (2006) 71–83.
- [53] P.B. Abada, S.B. Howell, Cisplatin induces resistance by triggering differentiation of testicular embryonal carcinoma cells, **PLoS One.** 9 (2014) e87444.
- [54] L.A. Garrett-Sinha, H. Eberspaecher, M.F. Seldin, B. de Crombrughe, A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated cells and transiently in certain mesechymal cells, **J. Biol. Chem.** 271 (1996) 31384–31390.
- [55] J.M. Shields, R.J. Christy, V.W. Yang, Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Krüppel-like factor expressed during growth arrest, **J. Biol. Chem.** 271 (1996) 20009–20017.
- [56] J.J. Bieker, Krüppel-like factors: three fingers in many pies, **J. Biol. Chem.** 276 (2001) 34355–34358.
- [57] W. Zhang, D.E. Geiman, J.M. Shields, D.T. Dang, C.S. Mahatan, K.H. Kaestner, J.R. Biggs, A.S. Kraft, V.W. Yang, The gut-enriched Kruppel-like factor (Krüppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter, **J. Biol. Chem.** 275 (2000) 18391–18398.
- [58] J.A. Segre, C. Bauer, E. Fuchs, Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin, **Nat. Genet.** 22 (1999) 356–360.
- [59] S. Ohnishi, S. Ohnami, F. Laub, K. Aoki, K. Suzuki, Y. Kanai, K. Haga, M. Asaka, F. Ramirez, T. Yoshida, Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Krüppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 308 (2003) 251–256.
- [60] P.M. Evans, C. Liu, Roles of Krüpel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells, **Acta Biochim. Biophys.** 40 (2008) 554–564.
- [61] Y. Liu, J. Wang, Y. Yi, H. Zhang, J. Liu, M. Liu, C. Yuan, D. Tang, I.J. Benjamin, X. Xiao, Induction of KLF4 in response to heat stress, **Cell Stress Chaperones.** 11 (2006) 379–389.
- [62] B. Zheng, M. Han, J.K. Wen, Role of Krüppel-like factor 4 in phenotypic switching and proliferation of vascular smooth muscle cells, **IUBMB Life.** 62

- (2010) 132–139.
- [63] B.B. McConnell, A.M. Ghaleb, M.O. Nandan, V.W. Yang, The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology, **BioEssays**. 29 (2007) 549–557.
- [64] M.O. Kim, S.-H. Kim, Y.-Y. Cho, J. Nadas, C.-H. Jeong, K. Yao, D.J. Kim, D.-H. Yu, Y.-S. Keum, K.-Y. Lee, Z. Huang, A.M. Bode, Z. Dong, ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4, **Nat. Struct. Mol. Biol.** 19 (2012) 283–290.
- [65] I. Aksoy, V. Giudice, E. Delahaye, F. Wianny, M. Aubry, M. Mure, J. Chen, R. Jauch, G.K. Bogu, T. Nolden, H. Himmelbauer, M. Xavier Doss, A. Sachinidis, H. Schulz, O. Hummel, P. Martinelli, N. Hübner, L.W. Stanton, F.X. Real, P.-Y. Bourillot, P. Savatier, Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells, **Nat. Commun.** 5 (2014) 1-15.
- [66] C.S. Park, Y. Shen, A. Lewis, H.D. Lacorazza, Role of the reprogramming factor KLF4 in blood formation, **J. Leukoc. Biol.** 99 (2016) 673–685.
- [67] H.S. Yoon, X. Chen, V.W. Yang, Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage, **J. Biol. Chem.** 278 (2003) 2101–2105.
- [68] B.D. Rowland, R. Bernards, D.S. Peeper, The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene, **Nat. Cell Biol.** 7 (2005) 1074–1082.
- [69] H. Ton-That, K.H. Kaestner, J.M. Shields, C.S. Mahatanankoon, V.W. Yang, Expression of the gut-enriched Krüppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis, **FEBS Lett.** 419 (1997) 239–243.
- [70] Z.Y. Chen, J. Shie, C. Tseng, Up-regulation of gut-enriched krüppel-like factor by interferon-gamma in human colon carcinoma cells, **FEBS Lett.** 477 (2000) 67–72.
- [71] J.P. Katz, N. Perreault, B.G. Goldstein, L. Actman, S.R. McNally, D.G. Silberg, E.E. Furth, K.H. Kaestner, Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach, **Gastroenterology**. 128 (2005) 935–945.
- [72] M.G. Kharas, I. Yusuf, V.M. Scarfone, V.W. Yang, J.A. Segre, C.S. Huettner, D.A. Fruman, KLF4 suppresses transformation of pre-B cells by ABL oncogenes, **Blood**. 109 (2007) 747–755.
- [73] K.W. Foster, A.R. Frost, P. Mckie-bell, C. Lin, J.A. Engler, W.E. Grizzle, J.M. Ruppert, Increase of GSK3 Messenger RNA and Protein Expression during Progression of Breast Cancer Increase of GSK3 Messenger RNA and Protein Expression during Progression of Breast Cancer 1, **Cancer Res.** 60 (2000) 6488–6495.
- [74] J. Ma, Y. Yao, P. Wang, Y. Liu, L. Zhao, Z. Li, Z. Li, Y. Xue, MiR-152 functions as a tumor suppressor in glioblastoma stem cells by targeting Krüppel-like factor 4, **Cancer Lett.** 355 (2014) 85–95.
- [75] T. Yu, X. Chen, W. Zhang, J. Liu, R. Avdiushko, D.L. Napier, a X. Liu, J.M. Neltner, C. Wang, D. Cohen, C. Liu, KLF4 regulates adult lung tumor-initiating cells and represses K-Ras-mediated lung cancer, **Cell Death Differ.** 23 (2015) 1–9.
- [76] Y. Jia, W. Zhang, H. Liu, L. Peng, Z. Yang, J. Lou, Inhibition of glutathione

- synthesis reverses Krüppel-like factor 4-mediated cisplatin resistance, **Cancer Chemother. Pharmacol.** 69 (2012) 377–385.
- [77] S.-K. Tai, M.-H. Yang, S.-Y. Chang, Y.-C. Chang, W.-Y. Li, T.-L. Tsai, Y.-F. Wang, P.-Y. Chu, S.-L. Hsieh, Persistent Krüppel-like factor 4 expression predicts progression and poor prognosis of head and neck squamous cell carcinoma, **Cancer Sci.** 102 (2011) 895–902.
- [78] J. Huang, K. Liu, D. Song, M. Ding, J. Wang, Q. Jin, J. Ni, Kruppel-like factor 4 promotes high-mobility group box 1-induced chemotherapy resistance in osteosarcoma cells, **Cancer Sci.** 107 (2016) 242–249.
- [79] Y. Jia, C. Zhang, L. Zhou, H. Xu, Y. Shi, Z. Tong, Micheliolide overcomes KLF4-mediated cisplatin resistance in breast cancer cells by downregulating glutathione, **Onco. Targets. Ther.** 8 (2015) 2319–2327.
- [80] D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, **Cell.** 116 (2004) 281–297.
- [81] K.F. Meza-Sosa, E.I. Pérez-García, N. Camacho-Concha, O. López-Gutiérrez, G. Pedraza-Alva, L. Pérez-Martínez, MiR-7 promotes epithelial cell transformation by targeting the tumor suppressor KLF4, **PLoS One.** 9 (2014) e103987.
- [82] M. Garg, MicroRNAs, stem cells and cancer stem cells, **World J. Stem Cells.** 4 (2012) 62-70.
- [83] H. Okuda, F. Xing, P.R. Pandey, S. Sharma, M. Watabe, S.K. Pai, Y.-Y. Mo, M. Iizumi-Gairani, S. Hirota, Y. Liu, K. Wu, R. Pochampally, K. Watabe, miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4, **Cancer Res.** 73 (2013) 1434–1444.
- [84] Y.-L. Chang, P.-J. Zhou, L. Wei, W. Li, Z. Ji, Y.-X. Fang, W.-Q. Gao, MicroRNA-7 inhibits the stemness of prostate cancer stem-like cells and tumorigenesis by repressing KLF4/PI3K/Akt/p21 pathway, **Oncotarget.** 6 (2015) 24017–24031.
- [85] C. Yan, J. Yu, Y. Liu, W. Kang, Z. Ma, L. Zhou, miR-32 promotes gastric carcinoma tumorigenesis by targeting Krüppel-like factor 4, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 467 (2015) 913–920.
- [86] Q. Mao, T. Quan, B. Luo, X. Guo, L. Liu, Q. Zheng, miR-375 targets KLF4 and impacts the proliferation of colorectal carcinoma, **Tumor Biol.** 37 (2016) 463–471.
- [87] J. Ji, P.S. Zheng, Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis, **Hum. Pathol.** 41 (2010) 1438–1447.
- [88] C. Dong, D. Wilhelm, P. Koopman, Sox genes and cancer, **Cytogenet. Genome Res.** 105 (2004) 442–447.
- [89] K. Weina, J. Utikal, SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic, **Clin. Transl. Med.** 3 (2014) 1-10.
- [90] K. Liu, B. Lin, M. Zhao, X. Yang, M. Chen, A. Gao, F. Liu, J. Que, X. Lan, The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis, **Cell. Signal.** 25 (2013) 1264–1271.
- [91] B. Boer, J. Kopp, S. Mallanna, M. Desler, H. Chakravarthy, P.J. Wilder, C. Bernadt, A. Rizzino, Elevating the levels of Sox2 in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells inhibits the expression of Sox2:Oct-3/4 target genes, **Nucleic Acids Res.** 35 (2007) 1773-1786.
- [92] N. Karachaliou, R. Rosell, S. Viteri, The role of SOX2 in small cell lung

- cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung, **Transl. Lung Cancer Res.** 2 (2013) 172–179.
- [93] Y. Chen, L. Shi, L. Zhang, R. Li, J. Liang, W. Yu, L. Sun, X. Yang, Y. Wang, Y. Zhang, Y. Shang, The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer, **J. Biol. Chem.** 283 (2008) 17969–17978.
- [94] A. Sarkar, K. Hochedlinger, The Sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate, **Cell Stem Cell.** 12 (2013) 15–30.
- [95] V. Episkopou, SOX2 functions in adult neural stem cells, **Trends Neurosci.** 28 (2005) 219–221.
- [96] J.H. Phi, S.-H. Park, S.H. Paek, S.-K. Kim, Y.J. Lee, C.-K. Park, B.-K. Cho, D.-H. Lee, K.-C. Wang, Expression of Sox2 in mature and immature teratomas of central nervous system, **Mod. Pathol.** 20 (2007) 742–748.
- [97] J.L. Kopp, B.D. Ormsbee, M. Desler, A. Rizzino, Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, **Stem Cells.** 26 (2008) 903–911.
- [98] S.M. Rodriguez-Pinilla, D. Sarrio, G. Moreno-Bueno, Y. Rodriguez-Gil, M. a Martinez, L. Hernandez, D. Hardisson, J.S. Reis-Filho, J. Palacios, Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer, **Mod. Pathol.** 20 (2007) 474–481.
- [99] M. Schmitz, a Temme, V. Senner, R. Ebner, S. Schwind, S. Stevanovic, R. Wehner, G. Schackert, H.K. Schackert, M. Fussel, M. Bachmann, E.P. Rieber, B. Weigle, Identification of SOX2 as a novel glioma-associated antigen and potential target for T cell-based immunotherapy, **Br. J. Cancer.** 96 (2007) 1293–1301.
- [100] A.J. Bass, H. Watanabe, C.H. Mermel, S. Yu, S. Perner, R.G. Verhaak, S.Y. Kim, L. Wardwell, P. Tamayo, I. Gat-Viks, A.H. Ramos, M.S. Woo, B. a Weir, G. Getz, R. Beroukhir, M. O'Kelly, A. Dutt, O. Rozenblatt-Rosen, P. Dziunycz, J. Komisarof, L.R. Chirieac, C.J. LaFargue, V. Scheble, T. Wilbertz, C. Ma, S. Rao, H. Nakagawa, D.B. Stairs, L. Lin, T.J. Giordano, P. Wagner, J.D. Minna, A.F. Gazdar, C.Q. Zhu, M.S. Brose, I. Cecconello, U.R. Jr, S.K. Marie, O. Dahl, R. a Shivdasani, M. Tsao, M.A. Rubin, K.K. Wong, A. Regev, W.C. Hahn, D.G. Beer, A.K. Rustgi, M. Meyerson, SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas, **Nat. Genet.** 41 (2009) 1238–1242.
- [101] L.M. Sholl, J.A. Barletta, B.Y. Yeap, L.R. Chirieac, J.L. Hornick, Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma, **Am. J. Surg. Pathol.** 34 (2010) 1193–1198.
- [102] T. Hussenet, S. Dali, J. Exinger, B. Monga, B. Jost, D. Dembelé, N. Martinet, C. Thibault, J. Huelsken, E. Brambilla, S. Du Manoir, SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas, **PLoS One.** 5 (2010) e8960.
- [103] Y. Gen, K. Yasui, Y. Zen, K. Zen, O. Dohi, M. Endo, K. Tsuji, N. Wakabayashi, Y. Itoh, Y. Naito, M. Taniwaki, Y. Nakanuma, T. Okanoue, T. Yoshikawa, SOX2 identified as a target gene for the amplification at 3q26 that is frequently detected in esophageal squamous cell carcinoma, **Cancer Genet. Cytogenet.** 202 (2010) 82–93.
- [104] R.M.R. Gangemi, F. Griffero, D. Marubbi, M. Perera, M.C. Capra, P.

- Malatesta, G.L. Ravetti, G.L. Zona, A. Daga, G. Corte, SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity, **Stem Cells**. 27 (2009) 40–48.
- [105] F. Ye, Y. Li, Y. Hu, C. Zhou, Y. Hu, H. Chen, Expression of Sox2 in human ovarian epithelial carcinoma, **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 137 (2011) 131–137.
- [106] C. Ren, T. Ren, K. Yang, S. Wang, X. Bao, F. Zhang, W. Guo, Inhibition of SOX2 induces cell apoptosis and G1/S arrest in Ewing's sarcoma through the PI3K/Akt pathway, **J. Exp. Clin. Cancer Res.** 35 (2016) 1–14.
- [107] X.L. Li, Y. Eishi, Y.Q. Bai, H. Sakai, Y. Akiyama, M. Tani, T. Takizawa, M. Koike, Y. Yuasa, Expression of the SRY-related HMG box protein SOX2 in human gastric carcinoma, **Int. J. Oncol.** 24 (2004) 257–263.
- [108] Y. Sanada, K. Yoshida, M. Ohara, M. Oeda, K. Konishi, Y. Tsutani, Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2, **Pancreas**. 32 (2006) 164–170.
- [109] T. Otsubo, Y. Akiyama, K. Yanagihara, Y. Yuasa, SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis, **Br. J. Cancer**. 98 (2008) 824–831.
- [110] K.B. Long, J.L. Hornick, SOX2 is highly expressed in squamous cell carcinomas of the gastrointestinal tract, **Hum. Pathol.** 40 (2009) 1768–1773.
- [111] Y. Chen, Y. Huang, L. Zhu, M. Chen, Y. Huang, J. Zhang, S. He, A. Li, R. Chen, J. Zhou, SOX2 inhibits metastasis in gastric cancer, **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 142 (2016) 1221–1230.
- [112] M. Piva, G. Domenici, O. Iriando, R. Miriam, I. Zabalza, R. Kypta, V. Comaills, I. Barredo, a L. Jose, M.M. Vivanco, Sox 2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells, **EMBO Mol. Med.** 6 (2014) 66–79.
- [113] Y. Li, K. Chen, L. Li, R. Li, J. Zhang, W. Ren, Overexpression of SOX2 is involved in paclitaxel resistance of ovarian cancer via the PI3K/Akt pathway, **Tumor Biol.** 36 (2015) 9823–9828.
- [114] L. Garros-regulez, P. Aldaz, O. Arrizabalaga, V. Moncho-Amor, E. Carrasco-Garcia, L. Manterola, L. Moreno-Cugnon, C. Barrena, J. Villanua, I. Ruiz, S. Pollard, R. Lovell-Badge, N. Sampron, I. Garcia, A. Matheu, mTOR inhibition decreases SOX2-SOX9 mediated glioma stem cell activity and temozolomide resistance, **Expert Opin. Ther. Targets**. 8222 (2016) 393–405.
- [115] Y. Yu, L. Tian, X. Feng, J. Cheng, Y. Gong, X. Liu, Z. Zhang, X. Yang, S. He, C.Y. Li, Q. Huang, eIF4E-phosphorylation-mediated Sox2 upregulation promotes pancreatic tumor cell repopulation after irradiation, **Cancer Lett.** 375 (2016) 31–38.
- [116] M.Y. Chou, F.W. Hu, C.H. Yu, C.C. Yu, Sox2 expression involvement in the oncogenicity and radiochemoresistance of oral cancer stem cells, **Oral Oncol.** 51 (2015) 31–39.
- [117] K. Ma, X. Pan, P. Fan, Y. He, J. Gu, W. Wang, T. Zhang, Z. Li, X. Luo, Loss of miR-638 in vitro promotes cell invasion and a mesenchymal-like transition by influencing SOX2 expression in colorectal carcinoma cells, **Mol. Cancer**. 13 (2014) 1-13.
- [118] Y. Xia, Y. Wu, B. Liu, P. Wang, Y. Chen, Downregulation of miR-638

- promotes invasion and proliferation by regulating SOX2 and induces EMT in NSCLC, **FEBS Lett.** 588 (2014) 2238–2245.
- [119] Y. Jin, Z. Jiang, X. Guan, Y. Chen, Q. Tang, G. Wang, X. Wang, miR-450b-5p Suppresses Stemness and the Development of Chemoresistance by Targeting SOX2 in Colorectal Cancer, **DNA Cell Biol.** 35 (2016) 1–8.
- [120] J. Jiang, Z. Li, C. Yu, M. Chen, S. Tian, C. Sun, MiR-1181 inhibits stem cell-like phenotypes and suppresses SOX2 and STAT3 in human pancreatic cancer, **Cancer Lett.** 356 (2015) 962–970.
- [121] Y. Zhang, G. Eades, Y. Yao, Q. Li, Q. Zhou, Estrogen receptor α signaling regulates breast tumor-initiating cells by down-regulating miR-140 which targets the transcription factor SOX2, **J. Biol. Chem.** 287 (2012) 41514–41522.
- [122] T. Otsubo, Y. Akiyama, Y. Hashimoto, S. Shimada, K. Goto, Y. Yuasa, MicroRNA-126 inhibits SOX2 expression and contributes to gastric carcinogenesis, **PLoS One.** 6 (2011) e16617.
- [123] I. Chambers, D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, a Smith, Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells, **Cell.** 113 (2003) 643–655.
- [124] K. Mitsui, Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, S. Yamanaka, The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells, **Cell.** 113 (2003) 631–642.
- [125] G. Pan, J.A. Thomson, Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency, **Cell Res.** 17 (2007) 42–49.
- [126] A. Yates, I. Chambers, The homeodomain protein Nanog and pluripotency in mouse embryonic stem cells, **Biochem. Soc. Trans.** 33 (2005) 1518–1521.
- [127] M.-L. Wang, S.-H. Chiou, C.-W. Wu, Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor, **Onco. Targets. Ther.** 6 (2013) 1207–1220.
- [128] A. Saunders, F. Faiola, J. Wang, Pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog, **Stem Cells.** 31 (2013) 1227–1236.
- [129] T. Ishiguro, A. Sato, H. Ohata, H. Sakai, H. Nakagama, K. Okamoto, Differential expression of nanog1 and nanogp8 in colon cancer cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 418 (2012) 199–204.
- [130] L.E. Santaliz-Ruiz IV, X. Xie, M. Old, T.N. Teknos, Q. Pan, Emerging role of Nanog in tumorigenesis and cancer stem cells, **Int. J. Cancer.** 135 (2014) 2741–2748.
- [131] C.R. Jeter, T. Yang, J. Wang, H.-P. Chao, D.G. Tang, NANOG in cancer stem cells and tumor development: an update and outstanding questions, **Stem Cells.** (2015) 1–12.
- [132] T.-T. Gu, S.-Y. Liu, P.-S. Zheng, Cytoplasmic NANOG-Positive Stromal Cells Promote Human Cervical Cancer Progression, **Am. J. Pathol.** 181 (2012) 652–661.
- [133] E.E. Ibrahim, R. Babaei-Jadidi, A. Saadeddin, B. Spencer-Dene, S. Hossaini, M. Abuzinadah, N. Li, W. Fadhil, M. Ilyas, D. Bonnet, A.S. Nateri, Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms, **Stem Cells.** 30 (2012) 2076–2087.

- [134] J. Zhang, L.A. Espinoza, R.J. Kinders, S.M. Lawrence, T.D. Pfister, M. Zhou, T.D. Veenstra, S.S. Thorgeirsson, J.M. Jessup, NANOG modulates stemness in human colorectal cancer, **Oncogene**. 32 (2013) 4397–4405.
- [135] Y.-L. Lin, Z.-B. Han, F.-Y. Xiong, L.-Y. Tian, X.-J. Wu, S.-W. Xue, Y.-R. Zhou, J.-X. Deng, H.-X. Chen, Malignant transformation of 293 cells induced by ectopic expression of human Nanog, **Mol. Cell. Biochem.** 351 (2011) 109–116.
- [136] X. Lu, S.J. Mazur, T. Lin, E. Appella, Y. Xu, The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis, **Oncogene**. 33 (2014) 2655–2664.
- [137] J. Han, F. Zhang, M. Yu, P. Zhao, W. Ji, H. Zhang, B. Wu, Y. Wang, R. Niu, RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G0/G1 cell cycle arrest in breast cancer cells, **Cancer Lett.** 321 (2012) 80–88.
- [138] S.H. Chiou, C.C. Yu, C.Y. Huang, S.C. Lin, C.J. Liu, T.H. Tsai, S.H. Chou, C.S. Chien, H.H. Ku, J.F. Lo, Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma, **Clin. Cancer Res.** 14 (2008) 4085–4095.
- [139] S. Nirasawa, D. Kobayashi, N. Tsuji, K. Kuribayashi, N. Watanabe, Diagnostic relevance of overexpressed Nanog gene in early lung cancers, **Oncol. Rep.** 22 (2009) 223–230.
- [140] Y. Pan, J. Jiao, C. Zhou, Q. Cheng, Y. Hu, H. Chen, Nanog is highly expressed in ovarian serous cystadenocarcinoma and correlated with clinical stage and pathological grade, **Pathobiology**. 77 (2011) 283–288.
- [141] H.M. Meng, P. Zheng, X.Y. Wang, C. Liu, H.M. Sui, S.J. Wu, J. Zhou, Y.Q. Ding, J.M. Li, Overexpression of nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer, **Cancer Biol. Ther.** 9 (2010) 295–302.
- [142] M.K.Y. Siu, E.S.Y. Wong, D.S.H. Kong, H.Y. Chan, L. Jiang, O.G.W. Wong, E.W.-F. Lam, K.K.L. Chan, H.Y.S. Ngan, X.-F. Le, a N. Cheung, Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of E-cadherin and FoxJ1 and contributes to adverse clinical outcome in ovarian cancers, **Oncogene**. 32 (2013) 3500–3509.
- [143] F. Xu, C. Dai, R. Zhang, Y. Zhao, S. Peng, C. Jia, Nanog: A potential biomarker for liver metastasis of colorectal cancer, **Dig. Dis. Sci.** 57 (2012) 2340–2346.
- [144] J. Zhang, X. Wang, B. Chen, Z. Xiao, W. Li, Y. Lu, J. Dai, The human pluripotency gene NANOG/NANOGP8 is expressed in gastric cancer and associated with tumor development, **Oncol. Lett.** 1 (2010) 457–463.
- [145] T. Lin, Y.-Q. Ding, J.-M. Li, Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma, **Med. Oncol.** 29 (2012) 878–885.
- [146] C. Sun, L. Sun, K. Jiang, D.M. Gao, X.N. Kang, C. Wang, S. Zhang, S. Huang, X. Qin, Y. Li, Y.K. Liu, NANOG promotes liver cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition through NODAL/SMAD3 signaling pathway, **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 45 (2013) 1099–1108.
- [147] F. Ye, C. Zhou, Q. Cheng, J. Shen, H. Chen, Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells, **BMC Cancer**. 8 (2008) 1-5.

- [148] X. Zhou, Y.-P. Zhou, G.-R. Huang, G. Bao-Lan, B. Yang, Z. Dong-Xia, P. Hu, S.-R. Xu, Expression of the stem cell marker Nanog in human endometrial adenocarcinoma, **Int J Gynecol Path.** 30 (2012) 262–270.
- [149] C. Hu, L. Xu, S. Liang, Z. Zhang, Y. Zhang, F. Zhang, Lentivirus-mediated shRNA targeting Nanog inhibits cell proliferation and attenuates cancer stem cell activities in breast cancer, *J. Drug Target.* 2330 (2015) 1–11.
- [150] S.H. Chiou, M.L. Wang, Y.T. Chou, C.J. Chen, C.F. Hong, W.J. Hsieh, H.T. Chang, Y.S. Chen, T.W. Lin, H.S. Hsu, C.W. Wu, Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation, **Cancer Res.** 70 (2010) 10433–10444.
- [151] Y. Lu, H. Zhu, H. Shan, J. Lu, X. Chang, X. Li, J. Lu, X. Fan, S. Zhu, Y. Wang, Q. Guo, L. Wang, Y. Huang, M. Zhu, Z. Wang, Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells, **Cancer Lett.** 340 (2013) 113–123.
- [152] W. Ji, Z. Jiang, Effect of shRNA-mediated inhibition of Nanog gene expression on the behavior of human gastric cancer cells, **Oncol. Lett.** 6 (2013) 367–374.
- [153] C. Gong, H. Liao, F. Guo, L. Qin, J. Qi, Implication of expression of Nanog in prostate cancer cells and their stem cells, **J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.** 32 (2012) 242–246.
- [154] M. Zbinden, A. Duquet, A. Lorente-Trigos, S.-N. Ngwabyt, I. Borges, A. Ruiz i Altaba, NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53, **EMBO J.** 29 (2010) 2659–2674.
- [155] C.R. Jeter, M. Badeaux, G. Choy, D. Chandra, L. Patrawala, C. Liu, T. Calhoun-Davis, H. Zaehres, G.Q. Daley, D.G. Tang, Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development, **Stem Cells.** 27 (2009) 993–1005.
- [156] C.E. Huang, C.C. Yu, F.W. Hu, M.Y. Chou, L.L. Tsai, Enhanced chemosensitivity by targeting Nanog in head and neck squamous cell carcinomas, **Int. J. Mol. Sci.** 15 (2014) 14935–14948.
- [157] J.J. Zhou, X.G. Deng, X.Y. He, Y. Zhou, M. Yu, W.C. Gao, B. Zeng, Q.B. Zhou, Z.H. Li, R.F. Chen, Knockdown of NANOG enhances chemosensitivity of liver cancer cells to doxorubicin by reducing MDR1 expression, **Int. J. Oncol.** 45 (2014) 2034–2040.
- [158] K. Arif, I. Hussain, C. Rea, M. El-Sheemy, The role of nanog expression in tamoxifen-resistant breast cancer cells, **Onco. Targets. Ther.** 8 (2015) 1327–1334.
- [159] S. Liu, J. Sun, B. Cai, X. Xi, L. Yang, Z. Zhang, Y. Feng, Y. Sun, NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance through activation of the STAT3 pathway in epithelial ovarian cancer, **Tumor Biol.** 37 (2016) 9671–9680.
- [160] C.S. Niu, Y. Yang, C.D. Cheng, miR-134 regulates the proliferation and invasion of glioblastoma cells by reducing Nanog expression, **Int. J. Oncol.** 42 (2013) 1533–1540.
- [161] M. li Han, F. Wang, Y. ting Gu, X. hong Pei, X. Ge, G. cheng Guo, L. Li, X. Duan, M.Z. Zhu, Y. meng Wang, MicroR-760 suppresses cancer stem cell

- subpopulation and breast cancer cell proliferation and metastasis: By down-regulating NANOG, **Biomed. Pharmacother.** 80 (2016) 304–310.
- [162] G. Ott, Impact of MYC on malignant behavior, **Hematology.** 2014 (2014) 100–106.
- [163] M. Cole, The myc oncogene: its role in transformation and differentiation, **Annu. Rev. Genet.** 20 (1986) 361–384.
- [164] J.P. Morton, O.J. Sansom, MYC-y mice: from tumour initiation to therapeutic targeting of endogenous MYC, **Mol. Oncol.** 7 (2013) 248–258.
- [165] Z.E. Stine, Z.E. Walton, B.J. Altman, A.L. Hsieh, C. V. Dang, MYC, metabolism, and cancer, **Cancer Discov.** 5 (2015) 1024–1039.
- [166] T. Wahlström, M. Arsenian Henriksson, Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism, **Biochim. Biophys. Acta.** 1849 (2015) 563–569.
- [167] T. Shalaby, M.A. Grotzer, MYC as therapeutic target for embryonal tumors: potential and challenges, **Curr. Cancer Drug Targets.** 16 (2015) 2–21.
- [168] M. Elend, M. Eilers, Cell growth: Downstream of Myc - To grow or to cycle?, **Curr. Biol.** 9 (1999) 936–938.
- [169] A.M. Petrich, C. Nabhan, S.M. Smith, MYC-associated and double-hit lymphomas: A review of pathobiology, prognosis, and therapeutic approaches, **Cancer.** 120 (2014) 3884–3895.
- [170] G. Fuhrmann, G. Rosenberger, M. Grusch, N. Klein, J. Hofmann, G. Krupitza, The MYC dualism in growth and death, **Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.** 437 (1999) 205–217.
- [171] M. Gabay, Y. Li, D.W. Felsher, MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance, **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** 4 (2014) 1–14.
- [172] V. Posternak, M.D. Cole, Strategically targeting MYC in cancer., **F1000Research.** 5 (2016) 1–7.
- [173] A. Kuzyj, S. Mai, c-Myc-induced genomic instability, **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** 4 (2014) a014373.
- [174] K.J. Campbell, R.J. White, MYC regulation of cell growth through control of transcription by RNA polymerases I and III, **Cold Spring Harb. Perspect. Med.** 4 (2014) 1–11.
- [175] C. Corzo, J.M. Corominas, I. Tusquets, M. Salido, M. Bellet, X. Fabregat, S. Serrano, F. Solé, The MYC oncogene in breast cancer progression: From benign epithelium to invasive carcinoma, **Cancer Genet. Cytogenet.** 165 (2006) 151–156.
- [176] S. Aulmann, c-Myc amplifications in primary breast carcinomas and their local recurrences, **J. Clin. Pathol.** 59 (2006) 424–4248.
- [177] M.A. Cichon, M.E. Moruzzi, T.A. Shqau, E. Miller, C. Mehner, S.P. Ethier, J.A. Copland, E.S. Radisky, D.C. Radisky, MYC is a crucial mediator of TGF β -induced invasion in basal breast cancer, **Cancer Research.** (2016) 3520-3530.
- [178] Y. Chen, O.I. Olopade, MYC in breast tumor progression, **Expert Rev. Anticancer Ther.** 8 (2008) 1689–1698.
- [179] A.D. Singhi, A. Cimino-Mathews, R.B. Jenkins, F. Lan, S.R. Fink, H. Nassar, R. Vang, J.H. Fetting, J. Hicks, S. Sukumar, A.M. De Marzo, P. Argani, MYC gene amplification is often acquired in lethal distant breast cancer metastases of unamplified primary tumors, **Mod. Pathol.** 25 (2012) 378–

- 387.
- [180] Y. Chen, J. Xu, S. Borowicz, C. Collins, D. Huo, O.I. Olopade, C-myc activates BRCA1 gene expression through distal promoter elements in breast cancer cells, **Bio Med Central Cancer**. 11 (2011) 1-13.
- [181] H. Yasue, A. Takeda, M. Ishibashi, Amplification of the c-myc gene and the elevation of its transcripts in human ovarian tumor lines, **Cell Struct. Funct.** 12 (1987) 121–125.
- [182] G. Schreiber, L. Dubeau, C-myc proto-oncogene amplification detected by polymerase chain reaction in archival human ovarian carcinomas, **Am. J. Pathol.** 137 (1990) 653–658.
- [183] T. Iba, J. Kigawa, Y. Kanamori, H. Itamochi, T. Oishi, M. Simada, K. Uegaki, J. Naniwa, N. Terakawa, Expression of the c-myc gene as a predictor of chemotherapy response and a prognostic factor in patients with ovarian cancer, **Cancer Sci.** 95 (2004) 418–423.
- [184] C.W. Taylor, Y.S. Kimb, K.E. Childress-Fields, L.C. Yeoman, Sensitivity of nuclear c-myc levels and induction to agents in human colon tumor cell lines, **Cancer Lett.** 62 (1992) 95–105.
- [185] B. Xu, P. Liu, J. Li, H. Lu, c-MYC depletion potentiates cisplatin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma: involvement of TSP-1 up-regulation, **Ann. Oncol.** 21 (2010) 670–672.
- [186] X.N. Pan, J.J. Chen, L.X. Wang, R.Z. Xiao, L.L. Liu, Z.G. Fang, Q. Liu, Z.J. Long, D.J. Lin, Inhibition of c-Myc overcomes cytotoxic drug resistance in acute myeloid leukemia cells by promoting differentiation, **PLoS One**. 9 (2014) e105381.
- [187] X. Yang, H. Cai, Y. Liang, L. Chen, X. Wang, R. Si, K. Qu, Z. Jiang, B. Ma, C. Miao, J. Li, B. Wang, P. Gao, Inhibition of c-Myc by let-7b mimic reverses multidrug resistance in gastric cancer cells, **Oncol. Rep.** 33 (2015) 1723–1730.
- [188] G. Citro, I. D’Agnano, C. Leonetti, R. Perini, B. Bucci, G. Zon, B. Calabretta, G. Zupi, c-myc antisense oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of cisplatin in melanoma chemotherapy in vitro and in nude mice, **Cancer Res.** 58 (1998) 283–289.
- [189] J.M. Reyes-Gonzalez, G.N. Armaiz-Pena, L.S. Mangala, F. Valiyeva, C. Ivan, S. Pradeep, I.M. Echevarria-Vargas, A. Rivera-Reyes, A.K. Sood, P.E. Vivas-Mejia, Targeting c-MYC in platinum-resistant ovarian cancer, **Mol. Cancer Ther.** 14 (2015) 2260–2269.
- [190] T.-Y. Fu, I.-C. Hsieh, J.-T. Cheng, M.-H. Tsai, Y.-Y. Hou, J.-H. Lee, H.-H. Liou, S.-F. Huang, H.-C. Chen, L.-M. Yen, H.-H. Tseng, L.-P. Ger, Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression, **J. Oral Pathol. Med.** 45 (2015) 89–95.
- [191] N. Kugimiya, A. Nishimoto, T. Hosoyama, K. Ueno, T. Enoki, T.S. Li, K. Hamano, The c-MYC-ABCB5 axis plays a pivotal role in 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells, **J. Cell. Mol. Med.** 19 (2015) 1569–1581.
- [192] H. Biliran, S. Banerjee, A. Thakur, F.H. Sarkar, A. Bollig, F. Ahmed, J. Wu, Y. Sun, J.D. Liao, c-Myc-induced chemosensitization is mediated by suppression of cyclin D1 expression and nuclear factor-kappa B activity in pancreatic cancer cells, **Clin Cancer Res.** 13 (2007) 2811–2821.

- [193] A.O. von Bueren, C. Oehler, T. Shalaby, K. von Hoff, M. Pruschy, B. Seifert, N.U. Gerber, M. Warmuth-Metz, D. Stearns, C.G. Eberhart, R.D. Kortmann, S. Rutkowski, M.A. Grotzer, c-MYC expression sensitizes medulloblastoma cells to radio- and chemotherapy and has no impact on response in medulloblastoma patients, **BMC Cancer**. 11 (2011) 1-11.
- [194] Z. Chen, H. Zeng, Y. Guo, P. Liu, H. Pan, A. Deng, J. Hu, miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc, **J. Exp. Clin. Cancer Res**. 29 (2010) 1-10.
- [195] Y. Shao, Y. Qu, S. Dang, B. Yao, M. Ji, MiR-145 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting c-Myc and Cdk6, **Cancer Cell Int**. 13 (2013) 1-9.
- [196] F. Wang, J. Xia, N. Wang, H. Zong, miR-145 inhibits proliferation and invasion of esophageal squamous cell carcinoma in part by targeting c-Myc., **Onkologie**. 36 (2013) 754–758.
- [197] W. Zhang, Q. Wang, M. Yu, N. Wu, H. Wang, MicroRNA-145 function as a cell growth repressor by directly targeting c-Myc in human ovarian cancer, *Technol. Cancer Res. Treat*. 13 (2014) 161–168.
- [198] W. He, Y. Li, X. Chen, L. Lu, B. Tang, Z. Wang, Y. Pan, S. Cai, Y. He, Z. Ke, miR-494 acts as an anti-oncogene in gastric carcinoma by targeting c-myc, **J. Gastroenterol. Hepatol**. 29 (2014) 1427–1434.
- [199] Y. Liu, X. Li, S. Zhu, J. Zhang, M. Yang, Q. Qin, S. Deng, B. Wang, K. Tian, L. Liu, Y. Niu, C. Wang, G. Zhao, Ectopic expression of miR-494 inhibited the proliferation, invasion and chemoresistance of pancreatic cancer by regulating SIRT1 and c-Myc, **Gene Ther**. 22 (2015) 1–10.
- [200] J. Yuan, K. Wang, M. Xi, miR-494 inhibits epithelial ovarian cancer growth by targeting c-Myc, **Med. Sci. Monit**. 22 (2016) 617–624.
- [201] M. Sachdeva, S. Zhu, F. Wu, H. Wu, V. Walia, S. Kumar, R. Elble, K. Watabe, Y.-Y. Mo, p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145, **Proc. Natl. Acad. Sci**. 106 (2009) 3207–3212.
- [202] V. Kashyap, N.C. Rezende, K.B. Scotland, S.M. Shaffer, J.L. Persson, L.J. Gudas, N.P. Mongan, Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs, **Stem Cells Dev**. 18 (2009) 1093–1108.
- [203] Z. Wei, Y. Yang, P. Zhang, R. Andrianakos, K. Hasegawa, J. Lyu, X. Chen, G. Bai, C. Liu, M. Pera, W. Lu, Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming, **Stem Cells**. 27 (2009) 2969–2978.
- [204] A. Rizzino, The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels, **Stem Cells**. 31 (2013) 1033–1039.
- [205] J. Wen, J.Y. Park, K.H. Park, H.W. Chung, S. Bang, S.W. Park, S.Y. Song, Oct4 and Nanog expression is associated with early stages of pancreatic carcinogenesis, **Pancreas**. 39 (2010) 622–626.
- [206] R. Yoshihama, K. Yamaguchi, I. Imajyo, M. Mine, N. Hiyake, N. Akimoto, Y. Kobayashi, S. Chigita, W. Kumamaru, T. Kiyoshima, Y. Mori, T. Sugiura, Expression levels of SOX2, KLF4 and brachyury transcription factors are associated with metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma, **Oncol. Lett**. 11 (2015) 1435–1446.

- [207] J. Yu, M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I.I. Slukvin, J.A. Thomson, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, **Science**. 318 (2007) 1917–1920.
- [208] T. Lin, C. Chao, S. Saito, S.J. Mazur, M.E. Murphy, E. Appella, Y. Xu, p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression, **Nat. Cell Biol.** 7 (2005) 165–171.
- [209] V.K. Singh, N. Kumar, M. Kalsan, A. Saini, R. Chandra, Mechanism of Induction: Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs), **J. Stem Cells**. 10 (2015) 43–62.
- [210] M. Stadtfeld, K. Hochedlinger, Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications, **Genes Dev.** 24 (2010) 2239–2263.
- [211] N. Malik, M.S. Rao, A review of the methods for human iPSC derivation, **Methods Mol. Biol.** 997 (2013) 23–33.
- [212] P. Zhang, R. Andrianakos, Y. Yang, C. Liu, W. Lu, Krüppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression, **J. Biol. Chem.** 285 (2010) 9180–9189.
- [213] S. Kawamata, H. Kanemura, N. Sakai, M. Takahashi, M. Go, Design of a Tumorigenicity Test for Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cell Products, **J. Clin. Med.** 4 (2015) 159–171.
- [214] Z. Liu, Y. Tang, S. Lü, J. Zhou, Z. Du, C. Duan, Z. Li, C. Wang, The tumourigenicity of iPS cells and their differentiated derivatives, **J. Cell. Mol. Med.** 17 (2013) 782–791.
- [215] G. Lenz, Transient oncogenes, **Med. Hypotheses**. 75 (2010) 660–662.
- [216] T.T. Lim, C. Geisen, M. Hesse, B.K. Fleischmann, K. Zimmermann, A. Pfeifer, Lentiviral vector mediated thymidine kinase expression in pluripotent stem cells enables removal of tumorigenic cells, **PLoS One**. 8 (2013) e70543.
- [217] R.A. Huddart, A.J. Birtle, Recent advances in the treatment of testicular cancer, **Expert Rev. Anticancer Ther.** 5 (2005) 123–138.
- [218] S. Koch, F. Mayer, F. Honecker, M. Schittenhelm, C. Bokemeyer, Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro, **Br. J. Cancer**. 89 (2003) 2133–2139.
- [219] S.K. Mallanna, B. Boer, M. Desler, A. Rizzino, Differential regulation of the Oct-3/4 gene in cell culture model systems that parallel different stages of mammalian development, **Mol. Reprod. Dev.** 75 (2008) 1247–1257.
- [220] M. Jez, S. Ambady, O. Kashpur, A. Grella, C. Malcuit, L. Vilner, P. Rozman, T. Dominko, Expression and differentiation between OCT4A and its pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells, **PLoS One**. 9 (2014) e89546.
- [221] Y. Kobayashi, T. Sugiura, I. Imajyo, M. Shimoda, K. Ishii, N. Akimoto, N. Yoshihama, Y. Mori, Knockdown of the T-box transcription factor brachyury increases sensitivity of adenoid cystic carcinoma cells to chemotherapy and radiation in vitro: Implications for a new therapeutic principle, **Int. J. Oncol.** 44 (2014) 1107–1117.
- [222] S.H. Lee, B.S. Koo, J.M. Kim, S. Huang, Y.S. Rho, W.J. Bae, H.J. Kang, Y.S. Kim, J.H. Moon, Y.C. Lim, SOX2 regulates self-renewal and

- tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma, **J. Pathol.** 111 (2014) 2122–2130.
- [223] N. V. Varlakhanova, R.F. Cotterman, W.N. DeVries, J. Morgan, L.R. Donahue, S. Murray, B.B. Knowles, P.S. Knoepfler, myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal, **Differentiation.** 80 (2010) 9-19.
- [224] I. Ben-Porath, M.W. Thomson, V.J. Carey, R. Ge, G.W. Bell, A. Regev, R.A. Weinberg, An embryonic stem cell–like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors, **Nat. Genet.** 40 (2008) 499–507.
- [225] Y. Du, L. Shi, T. Wang, Z. Liu, Z. Wang, Nanog siRNA plus cisplatin may enhance the sensitivity of chemotherapy in esophageal cancer, **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 138 (2012) 1759–1767.
- [226] L. Yang, X. Zhang, M. Zhang, J. Zhang, Y. Sheng, X. Sun, Q. Chen, L.-X. Wang, Increased Nanog expression promotes tumor development and cisplatin resistance in human esophageal cancer cells, **Cell. Physiol. Biochem.** 30 (2012) 943–952.
- [227] P. Lito, C.A. Pratilas, E.W. Joseph, M. Tadi, E. Halilovic, M. Zubrowski, A. Huang, W.L. Wong, M.K. Callahan, T. Merghou, J.D. Wolchok, E. Stanchina, S. Chandarlapaty, P.I. Poulikakos, J.A. Fagin, N. Rosen, Relief of profound feedback inhibition of mitogenic signaling by raf inhibitors attenuates their activity in brafv600e melanomas, **Cancer Cell**, 22 (2012) 668-682.

CURRICULUM VITAE

Villodre, ES

DADOS PESSOAIS

Nome: Emilly Schlee Villodre

Local e data de nascimento: Porto Alegre, RS, Brasil, 15/12/1985

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500 Setor IV Prédio 43431 Lab 115. Agronomia, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 91501-970

Telefone profissional: 51.33087620 **E-mail:** emillyvillodre@gmail.com

FORMAÇÃO

2012-2016: Doutorado em Biologia Celular e Molecular, UFRGS

2010-2012: Mestrado em Biologia Celular e Molecular, UFRGS

2006-2010: Bacharelado em Ciências Biológicas, UFRGS

EXPERIÊNCIAS EM PESQUISA:

2014: Aluna de doutorado-sanduiche no laboratório da Dr. Alejandra Guberman, na Universidade de Buenos Aires, Argentina.

2012-2016: Pesquisas relacionadas a obtenção da tese de doutorado, pela UFRGS sob orientação do Prof. Dr. Guido Lenz com ênfase em silenciamento de genes de pluripotência em teratocarcinoma, tratamento com cisplatina e etoposídeo.

2010-2012: Mestrado com ênfase em Células Tronco Tumorais pela UFRGS sob orientação do Prof. Dr. Guido Lenz

2009: Estágio na empresa BioPlus - Desenvolvimento Biotecnológico sob supervisão da MSc. Marcia Rodrigues Sandri

2006-2010: Iniciação Científica sob orientação do Prof. Dr. Guido Lenz com ênfase em Sistema Purinérgico e Células Tronco Tumorais.

EXPERIÊNCIA DIDÁTICA:

- Biofísica Metodológica, curso de Biotecnologia, 2010/2, 15 h, sob supervisão do Prof. Dr. Guido Lenz
- Métodos Biofísicos de Análise, curso de Biologia, 2011/1, 15 h, sob supervisão do Prof. Dr. Guido Lenz
- Biofísica Biomédica II, curso de Biomedicina, 2013/1, 30 h, sob supervisão do Prof. Dr. Guido Lenz
- Biologia Molecular e Celular do Câncer, curso de Biologia e Biomedicina, 2015/2, 30 h, sob supervisão do Prof. Dr. Guido Lenz

PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES

- Thomé, MP; Filippi-Chiela, EC; Villodre, ES; Migliavaca, CB; Onzi, GR; Felipe, KB; Lenz, G. Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, 2016.
- Villodre, ES; Kipper, FC; Pereira, MB; Lenz, G. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. **Cancer Treatment Reviews**, 2016.
- Silva, AO; Felipe, KB; Villodre, ES; Lopez, PLC; Lenz, G. A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. **Tumor Biology**, 2016.
- Solari, C; Vázquez Echeagaray, C; Cosentino, MS; Petrone, MV; Waisman, A; Luzzani, C; Francia, M; Villodre, E; Lenz, G; Miriuka, S; Barañao, L; Guberman, A. Manganese Superoxide Dismutase Gene Expression Is Induced by Nanog and Oct4, Essential Pluripotent Stem Cells Transcription Factors. **PLoS One**, 2015;10:e0144336.
- Filippi-Chiela, EC; Villodre, ES; Zamin, LI; Lenz, G. Autophagy Interplay with Apoptosis and Cell Cycle Regulation in the Growth Inhibiting Effect of Resveratrol in Glioma Cells. **PLoS One**, 2011;6:e20849.
- Ledur, PF; Villodre, ES; Paulus, R; Cruz, LA; Flores, DG; Lenz, Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. **Purinergic Signalling**, 2011;7:1-10.
- Tamajusuku, ASK; Villodre, ES; Paulus, R; Coutinho-Silva, R; Battastini, AMO; Wink, MR; Lenz, G. Characterization of ATP-Induced Cell Death in

the GL261 Mouse Glioma. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2010;109:983-991.

- Vargas AE; Cechim, G; Correa, JF; Gomes, PA; Macedo, GS; Medeiros, RM; Rauber, R; Villodre, ES; Chies, JAB. Pros and cons of a missing chemokine receptor. Comments on “Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-Δ32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion” by Eric Faure and Manuela Royer-Carenzi (2008). **Infection, Genetics and Evolution**, 2009;1:1.

PRINCIPAIS RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

- Villodre, ES; Iopez, PLC; Lenz, G. Human Glioblastoma Cancer Stem Cells are Sensitive to Doxorubicin and Temozolomide. *2012 Annual Meeting of American Society of Cellular Biology*, 2012, San Francisco.
- Villodre, ES; Iopez, PLC; Lenz, G. Human Glioblastoma Cancer Stem Cells are Sensitive to Doxorubicin and Temozolomide. *10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology*, 2012, Rio de Janeiro.
- Villodre, ES; Iopez, PLC; Lenz, G. Pharmacological Strategies to Reduce the Tumor Stem Cell Population. *XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society*, 2012, Foz do Iguaçu.
- Villodre, ES; Ledur, PF; Lenz, G. Extracellular ATP reduces tumorsphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. *Gordon Research Conference on Stem Cells & Cancer*, 2011, Ventura.
- Villodre, ES; Ledur, PF; Lenz, G. Purinergic Signaling Affects Tumor-Spheres Growth in Human Glioblastomas. *XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq*, 2009, Águas de Lindóia.
- Villodre, ES; Ledur, PF; Lenz, G. Resveratrol e Temozolamida Atuam no Crescimento de Tumor-Esferas e Reduzem o Número de Células CD133+ na Linhagem de Glioblastoma Humano U87. *XXI Salão de Iniciação Científica*, 2009, Porto Alegre.

- Villodre, ES; Lenz, G. Estudo da Expressão de Marcadores de Células Tronco Tumoriais em Gliomas Humanos. *XX Salão de Iniciação Científica*, 2008, Porto Alegre.
- Villodre, ES; Cruz, LA; Tamajusuku, ASK; Paulus, R; Lenz, G. Expressão de Receptores Purinérgicos em Linhagens Celulares de Gliomas. In: *XIX Salão de Iniciação Científica*, 2007, Porto Alegre.

PRINCIPAIS PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS E CONGRESSOS

- 36a Semana Científica do HCPA. *Efeito do silenciamento de Oct4 na formação de teratomas*. 2016 (Encontro)
- XVI Encontro do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular. *Effect of Oct4 knockdown in teratoma tumors after cisplatin and etoposide treatment*. 2015. (Encontro).
- 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology. *Human Glioblastoma Cancer Stem Cells are Sensitive to Doxorubicin and Temozolomide*. 2012. (Congresso).
- 2012 Annual Meeting of American Society of Cellular Biology. *Human Glioblastoma Cancer Stem Cells are Sensitive to Doxorubicin and Temozolomide*. 2012. (Congresso).
- XLI Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. *Pharmacological Strategies to Reduce the Tumor Stem Cell Population*. 2012. (Congresso).
- Gordon Research Conference on Stem Cells & Cancer. *Extracellular ATP reduces tumorsphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells*. 2011. (Congresso).
- XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. *Influence of Resveratrol, Quercetin and Temozolomide in in vitro Formation of Tumor-Spheres in Human Glioblastoma*. 2010. (Congresso).
- Radicais Livres: Verdades, Falácias, Angústias e Expectativas. 2010. (Simpósio).
- XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia

Molecular - SBBq. *Purinergic Signaling Affects Tumor-Spheres Growth in Human Glioblastomas*. 2009. (Congresso).

- Simpósio sobre Terapias Inovadoras. 2009. (Simpósio).
- XX Salão de Iniciação Científica. *Estudo da expressão de marcadores de células tronco tumorais em gliomas humanos*. 2008. (Outra).
- X Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM. *Caracterização da expressão de marcadores de células tronco tumorais em glioma humano*. 2008. (Outra).
- Curso de Imunoematologia Eritrocitária: Ênfase em Fenotipagem Eritrocitária. 2008. (Outra).
- Simpósio Gaúcho Sobre Terapia Gênica e Celular. 2007. (Simpósio).
- XIX Salão de Iniciação Científica. *Expressão de Receptores Purinérgicos em Linhagens Celulares de Gliomas*. 2007. (Outra).
- IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM. *Expressão de Receptores Purinérgicos em Linhagens Celulares de Gliomas*. 2007. (Outra).
- XIX Salão de Iniciação Científica. *Expressão de Receptores Purinérgicos em Linhagens Celulares de Gliomas*. 2007. (Outra).
- XVIII Salão de Iniciação Científica. 2006. (Outra).

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

- Lenz, G; Villodre, ES; Filippi-Chiela, EC; Kipper, FC; Silva, MB; Thomé, MP; Onzi, G; Vigna, A; Pereira, MB; Minussi, DC; Viegas, MS; Felipe, KB; Silva, AO; Hütten, MO; Breitenbach, K. *V Estudo Da Sinalização Celular No Câncer - Metodologias*. 2015. (Outro).
- Lenz, G; Villodre, ES; Filippi-Chiela, EC; Kipper, FC; Silva, MB; Thomé, MP; Felipe, KB; Dalberto, T; Ledur, PF; Hütten, M.O. *IV Estudo Da Sinalização Celular No Câncer - Metodologias*. 2014. (Outro).
- Lenz, G; Villodre, ES; Filippi-Chiela, EC; Silva, AO; Minussi, DC; Thomé, MP; Kipper, FC; Silva, MA; Dalberto, T. *III Estudo Da Sinalização Celular No Câncer - Metodologias*. 2013. (Outro).
- Lenz, G; Villodre, ES; Vargas, JE; Filippi-Chiela, EC; Silva, AO; Dalberto, T;

Ledur, PF; Thomé, MP; Silva, MB *II Estudo da Sinalização Celular no Câncer - Metodologias*. 2012. (Outro).

- Carlini, C; Margis, R; Ritt, ABB; Nör, C; Villodre, ES; Munari, FM; Almeida, M; Abreu Neto, JB; Perini, P; Jorge, PM; Cecagno, R; Braun, RL; Ferreira Junior, SLM. *Curso de Férias - Plantas... Como funcionam?*.2011. (Outro).
- Lenz, G; Lopez, PLC; Villodre, ES; Silva, AO; Filippi-Chiela, EC; Pelegrini, AL; Vargas, JE; Ledur, PF; Kipper, FC; Hütten, MO; Thomé, MP; Suhre, T; Minussi, DC. *Estudo da Sinalização Celular no Câncer*. 2011. (Outro).
- Carlini, C; Margis, R; Pelegrini, AL; Villodre, ES; Silva, AO; Sperotto, ARM; Nör, C; Tichota, DM; Bordin, DL; Pereira, JQ; Ceolato, JC; Siebert, M; Barbieri, NL; Perini, P; Lopes, FC. *Curso de Férias: Você conhece a célula?*. 2010. (Outro).
- Carlini, C; Margis, R; Pelegrini, AL; Barbieri, NL; Villodre, ES; Filippi-Chiela, EC; Vargas Filho, EF; Maboni, F; Salton, GD; Vargas, JE; Sachett, LG; Lopez, PLC; Velho, RV; Weber, SS; Feder, V. *Curso de Férias - Microrganismos: Mocinhos ou Bandidos?*. 2009. (Outro).
- Carlini, C; Margis, R; Pelegrini, AL; Barbieri, NL; Pinhatti, VR; Sandri, MR; Crestani, J; Sousa, FG; Matuo, R; Lopez, PLC; Villodre, ES; Reck, J. *Curso de Férias - Microrganismos: O Mundo Que Não Enxergamos*. 2009. (Outro).

AUXÍLIO FINANCEIRO

2012-2016: Bolsista de Doutorado - CAPES

2010-2012: Bolsista de Mestrado - CNPq

2006-2010: Bolsista de Iniciação Científica – PIBIC