

# ELIMINAÇÃO DO GENE RASSF9 NA LINHAGEM DE MELANOMA B16F0 ATRAVÉS DE CRISPR/CAS9

*Data de aceite: 02/05/2024*

**Julia Souza e Costa**

papel de RASSF9 em vias bioquímicas intracelulares e outros aspectos da biologia tumoral.

**RESUMO:** O melanoma é o câncer originado pela transformação de melanócitos, sendo o mais letal entre os cânceres de pele. Pode ser dividido em quatro grupos dependendo da mutação presente, sendo mais incidentes alterações nas proteínas B-Raf e Ras. A proteína Ras está associada a diferentes cascatas de sinalização, regulando processos como proliferação, diferenciação, morfologia, apoptose. Os principais efetores de Ras na morte celular são membros da família RASSF (*Ras-association Family*). RASSF9 foi implicado na diferenciação dos queratinócitos e na homeostase dermal e, interessantemente, sua expressão pode ser induzida por exposição solar. Para estudar o papel de RASSF9 em melanomas, iremos eliminar a expressão deste gene na linhagem murina B16F0, através do sistema CRISPR/Cas9. Após seleção de linhagem estável transfectante (B16F0.R9KO), iremos avaliar o impacto da nossa manipulação no crescimento tumoral in vitro e in vivo, bem como na resistência a quimioterápicos. Finalmente, esta linhagem servirá como ferramenta para novos estudos sobre o

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Durante o período de maio a novembro de 2022, focamos em cultivar as células B16F0, selecionar a concentração ideal do antibiótico, transformar bactérias competentes, amplificar plasmídeos, transfectar HEK293T, produzir o Lentivírus e transduzir a linhagem com lentivírus LentiCRISPRv2 carregando a sequência validada de sgRNA para RASSF9. Sem experiência prévia em laboratório, os primeiros meses foram fundamentais para conhecer e aprimorar técnicas laboratoriais.

Nos meses seguintes, realizamos a extração e trabalhamos o uso de ácidos nucleicos, extração de RNA, síntese de cDNA, reação de qPCR, eletroforese em gel de agarose, marcação de proteínas específicas, obtenção de extrato proteico, eletroforese de proteínas em gel de Poliacrilamida (SDS Page), Western blot, ensaio de crescimento e ensaios de resistência a quimioterápico.

## METODOLOGIA

### Linhagem celular

Células da linhagem de melanoma murino B16F0 foram cultivadas em meio RPMI 10% e renais de embrião humano HEK293T. A primeira foi crescida em meio RPMI 10%, enquanto as HEK293T, em DMEM 10%.

### Meio de Cultura

Cultivamos as células em meios RPMI-1640 (Thermo Fisher), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Thermo Fisher), 1% de L-Glutamina (Thermo Fisher) e 1% dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher); DMEM (Thermo Fisher), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Thermo Fisher), 2mM de L-Glutamina (Thermo Fisher) e 100 µg/ml dos antibióticos penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher); SOB (2% Bacto-tryptone, 0,5% yeast-extract, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O mili-Q qsp 600mL, ajustando o pH para 7,0); SOB ágar (100mL do SOB após ajustar pH e adiciona-se 1,5g de Bacto Agar); Luria-Bertani ([LB] Kasvi); LB ágar (Kasvi).

### Preparação de bactérias supercompetentes DH5a

Efetuamos a produção de bactérias supercompetentes DH5a com o método Inoue. Plaqueamos as bactérias em meio SOB ágar previamente preparados e incubamos overnight à 37°C para ocorrer crescimento. No dia seguinte, selecionamos uma colônia isolada e transferimos para um Erlenmeyer contendo 10ml de meio SOB estéril (pré-inóculo), incubando o frasco sob agitação, overnight (37°C, 300rpm). A bactéria deve crescer com uma densidade óptica de 400-600nm, para isso, aguardamos 18 horas e inserimos 3ml dessa solução em um Erlenmeyer estéril contendo 50 ml de meio SOB (inóculo) e incubamos por 1 hora sob agitação (150rpm). Medimos a absorbância em espectrofotômetro e quando foi atingido o valor da OD 600, os 50ml do inóculo foram transferidos para um tubo falcon, incubados 10 minutos em gelo e centrifugados (3200g por 15 minutos à 4°C). Ressuspendemos o pellet com 20ml de buffer ITB estéril e incubamos no gelo por 10 minutos, repetindo a centrifugação e ressuspendendo o pellet delicadamente com 4ml de buffer ITB. Adicionamos 280ul de DMSO e incubamos em tubo falcon no gelo por 10 minutos. Homogeneizadas as bactérias, dispensamo-las em alíquotas de 100ul em tubos eppendorf e as submergimos rapidamente em recipiente contendo nitrogênio líquido para promover o congelamento rápido.

## Amplificação dos plasmídeos LentiCRISPRv2

Utilizamos as bactérias preparadas para amplificação dos plasmídeos LentiCRISPRv2 vetor vazio contendo os genes de resistência à ampicilina, para a seleção das bactérias, e à puromicina, para selecionar as células de mamíferos, como também, o plasmídeo lentiRASSF9, contendo as sequências descritas anteriormente, e ainda o gene responsável pela codificação da proteína Cas9, fusionada ao epítipo Flag. Para isso, transformamos as bactérias Sbl3 pelo método choque térmico. Adicionamos os plasmídeos as bactérias e incubamos no gelo por 30 minutos, depois 2 minutos a 42°C, e por fim, repetimos os 2 minutos no gelo. Acrescentamos 1 mL de meio LB ao tubo que foi submetido a agitação por uma hora (37°C). Passado esse período, inoculamos as bactérias transformadas em placa de petri contendo meio LB-ágar 1,5% com 100µg/ml de ampicilina e incubamos a 37°C por 18 horas. Plaqueamos as bactérias em meio líquido para a extração de DNA plasmidial.

## Produção das partículas lentivirais

Partículas lentivirais derivadas do vetor vazio e do vetor contendo sgRNA RASSF9 foram produzidas em células 293T. Para a produção dos lentivírus, as células HEK 293T foram mantidas previamente em meio de cultura DMEM 10% por alguns dias antes do início do protocolo. No dia anterior à transfecção, foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  células HEK293T por poço em uma placa de 6 poços. Após cerca de 24 horas, confirmou-se a confluência de cerca de 80% para a realização da transfecção. Na transfecção, incubamos 1 ml de uma solução contendo 5µg do vetor vazio (LentiCRISPR.v2) ou clonado com o sgRNA de RASSF9 (LentiCRISPR.sgRNA.R9), 3.5µg do plasmídeo de empacotamento helper (pCMV-VSV-G), 2.5µg do plasmídeo do envelope (psPAX-2), 22,5 µl de Polyethylenimine 1mg/mL (PEI) e completou-se com DMEM sem soro para ajustar o volume para 1 mL. Como controle da transfecção, as células HEK 293T não receberam o plasmídeo LentiCRISPR.v2. No dia seguinte, trocou-se cuidadosamente o meio de cultura, para coletar o sobrenadante viral 24h após essa troca.

## Transdução de células B16F0 com sobrenadante viral

Para realizar a etapa de transdução, utilizamos duas placas de 6-wells, sendo que uma dessas placas foi usada como controle. Foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  células B16F0 em cada um desses 12 poços com 2ml de RPMI10%. No dia seguinte, retiramos 1500µl de meio de cada poço e incubamos 1000µl dos sobrenadantes coletados (uma placa para a solução com LentiCRISPR.v2 vetor vazio e a outra para a solução com o LentiRASSF9) na presença de Polybrene (5µg/ml - Sigma-Aldrich), a 37°C, 5% CO<sup>2</sup>. Passadas 48 horas, foi adicionado Puromicina (Invitrogen) para seleção das células transfectadas. Durante 7 dias seguintes, as células foram mantidas na presença de puromicina e repicadas sempre que necessário.

## Extração e Uso de Ácidos Nucleicos

### *Extração de RNA*

Lavamos com PBS 1X as linhagens celulares B16F0, B16F0.EV e B16F0.R9KO, desaderimos com tripsina, coletamos e centrifugamos por 5 minutos a 500 x g. Ressuspendemos o pellet formado em meio de cultivo, contamos as células e separamos  $1 \times 10^6$  células. Centrifugamos a 500 x g e ressuspendemos o pellet em 500  $\mu$ L de TRIzol™ reagent (ThermoFisher). Congelamos essa solução em freezer -80°C.

Para realizar a extração, descongelamos em gelo as amostras congeladas e adicionamos 100  $\mu$ L de clorofórmio. Homogeneizamos as amostras e mantivemos a temperatura ambiente por 3 minutos. Decorrido esse tempo, centrifugamos as amostras a 12.000 x g a 4°C por 15 minutos.

Nessa etapa, obtivemos 3 fases, sendo que a fase superior é a que está presente o RNA. Coletamos a fase superior e adicionamos 250  $\mu$ L de isopropanol. Vortexeamos as amostras e mantivemos em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, centrifugamos a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C. Descartamos o sobrenadante, adicionamos ao pellet 500  $\mu$ L de etanol gelado 75% e centrifugamos a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Repetimos a etapa com etanol mais duas vezes, removemos o excesso de etanol e aguardamos a evaporação completa do etanol. Adicionamos 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O DNase free/RNase free nas amostras e incubamos a 60°C por 10 minutos. Passados os 10 minutos, colocamos rapidamente as amostras em gelo e quantificadas no Nanodrop 2000 (ThermoFisher).

### *Síntese de cDNA*

Utilizamos o RNA extraído para a síntese do cDNA seguindo os passos do tópico 3.7.1. Utilizamos a enzima ImProm-II™ Rever Transcripase (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Na solução de volume total de 10  $\mu$ L, adicionamos 2  $\mu$ g de RNA e 0,5  $\mu$ g de oligo(dT) 12-18 (ThermoFisher). Incubamos as amostras a 70°C por 5 minutos e em seguida por mais 5 minutos em gelo. Adicionamos a essa solução o volume para 1X do *ImProm-II reaction buffer*, 3mM de MgCl<sub>2</sub> 0.5mM de cada dNTP e 1 $\mu$ L da enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase. Incubamos por 1 hora a 42°C a solução de volume final 20  $\mu$ L e seguimos com a inativação da enzima por incubação a 70°C por 15 minutos. Estocamos o produto a -20°C até ser utilizado na qPCR.

### *Reação de qPCR*

Aplicamos a reação de qPCR para determinar o nível de expressão dos genes RASSF9 e b-actina. Para a mistura de reação, adicionamos 5 $\mu$ l de SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher), 100 ng de cDNA e a concentração padronizada de cada par de

*primer*. Ajustamos o volume com H<sub>2</sub>O DNase free/RNase free para 10 µL. Na amplificação, usamos os valores do *threshold cycle* (CT) de cada amostra, adquiridos na fase exponencial da reação para os cálculos 2- $\Delta\Delta C_t$ . Regularizamos os valores pelo *housekeeping*  $\beta$ -actina.

#### *Eletroforese em Gel de Agarose*

Para realizar a eletroforese em gel de agarose (1% e 2%) conforme descrito por Sambrook e Russel (J. SAMBROOK, D.W. RUSSEL, 2001), dissolvemos a agarose em TAE e submergimos o gel no mesmo tampão. Em seguida, uma diferença de potencial (70V a 100V) foi aplicada sob amperagem constante. Coramos as moléculas com brometo de etídeo 0,5 µL por 20 minutos e visualizamos em transiluminador com luz UV (260 nm).

### **Marcação de proteínas específicas**

#### *Obtenção de extrato proteico*

Lavamos 10<sup>6</sup> unidades celulares utilizando solução salina tamponada (PBS) 1X, por duas vezes, com centrifugação de 5 minutos a 5000 x g. Em sequência, adicionamos ao material coletado um tampão de amostra para proteínas 1X e submetemos a uma incubação de 5 minutos a 95°C. O produto foi conservado em temperatura de -20°C até o momento de sua manipulação.

#### *Eletroforese de proteínas em gel de Poliacrilamida (SDS Page)*

Inserimos as amostras, acompanhadas do marcador de massa molecular de proteína *BenchMarck Ladder* (Invitrogen) em um gel de poliacrilamida desnaturante contendo soluções e concentrações adequadas. Então, posteriormente submetemos os géis à técnica de *Western blotting*.

#### *Western blot*

Para analisarmos a expressão de proteínas específicas utilizando anticorpos, transferimos as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham HybondTM-C, GE Healthcare) após a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida. Realizamos a transferência utilizando um tampão específico em sistema SemiDry (BioRad), com 30 V por 30 minutos.

Coramos a membrana com Ponceau S 0,1% em 1% de ácido acético depois de realizarmos a transferência. Realizamos o bloqueio utilizando leite integral 5% em PBS 0,1% Tween 20, com agitação constante por 1 hora à temperatura ambiente. Adicionamos o anticorpo primário e incubamos à temperatura ambiente com agitação leve. Os anticorpos utilizados nesse processo foram RASSF9 *Polyclonal Antibody* (Invitrogen) 1:500 e  $\beta$ -actin (8H10D10) *mouse* mAb #3700 (Cell Signaling Technology) 1:1000, nas diluições informadas. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS/0,1% Tween 20, e em

seguida, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário  $\alpha$ -IgG de camundongo (1:1000) e de coelho (1:1000) conjugados com HRP, ambos diluídos em solução de leite 5% em PBS 0,1% Tween 20 por 1 hora, com agitação constante. Realizamos lavagens após a incubação com o anticorpo secundário e a revelação foi realizada com ECL caseiro utilizando o equipamento ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

## Ensaio de Crescimento

Para avaliação da capacidade proliferativa da linhagem nocaute obtida, uma curva de crescimento será realizada, plaqueando-se  $1 \times 10^4$  células por poço de placas de 6 poços. Após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, as células serão isoladas, coradas com azul de tripan 0,2% e contadas com auxílio do contador automático Countess II (Thermo Fisher).

## Ensaio de resistência a quimioterápicos

Para avaliar o efeito da ausência de RASSF9 nas células B16F0 na resistência à apoptose, células B16F0 e B16F0.R9KO serão incubadas com diferentes concentrações de estaurosporina e a indução de apoptose avaliada pela marcação com  $2\mu\text{g/ml}$  de Anexina V conjugada com Alexa Fluor 647 e 50nM de Sytox Green (Thermo Fisher), utilizando-se a técnica de citometria de fluxo (BD FACSCanto™ II). Os dados serão analisados utilizando o software FlowJo v10.

## RESULTADOS

### Cultivo celular

Sendo a técnica mais fundamental empregada em nosso projeto, meu treinamento se iniciou com a prática do cultivo de células. Células B16-F0 foram descongeladas, crescidas e congeladas até que me tornasse proficiente. Na Figura 2, estão representados diferentes estágios do processo, desde o momento que foram tripsinizadas (Figura 2A), até atingirem confluência em diferentes aumentos (Figura 2B-D)

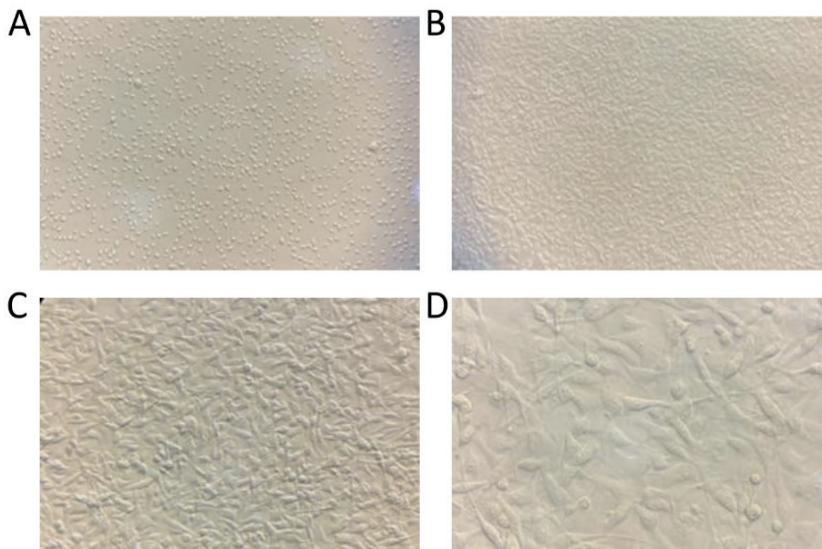


Figura 2. Imagem representativa de culturas do plaqueamento de  $1 \times 10^5$  células B16F0 em meio RPMI10% FCS. **A**,  $1 \times 10^5$  células/ml B16F0 imediatamente após serem tripsinizadas em aumento 0,5x. **B**,  $5 \times 10^6$  células/ml B16F0 quatro dias após serem tripsinizadas em aumento 0,5x. **C**,  $5 \times 10^6$  células/ml B16F0 quatro dias após serem tripsinizadas em aumento 10x. **D**,  $5 \times 10^6$  células/ml B16F0 quatro dias após serem tripsinizadas em aumento 20x.

### Estabelecimento da concentração de Puomicina para a seleção das células transduzidas

Antes de iniciarmos a transdução das células B16-F0, estabelecemos a concentração ideal de puomicina a ser utilizada na seleção das células transduzidas. Para isso,  $1 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de 6 poços e após 24h, diferentes concentrações do antibiótico (0,6-1,4 $\mu$ g/ml) foram adicionadas aos respectivos poços. Além das concentrações testadas (**Figura 3. A-E**), as B16F0 foram plaqueadas no mesmo dia, porém sem a presença de antibiótico para utilizar como controle (**Figura 3.F**). Foi escolhida a concentração 1,2  $\mu$ g/ml de puomicina por ter sido a concentração em que 90%-95% das células morreram em 3 dias a 5 dias.



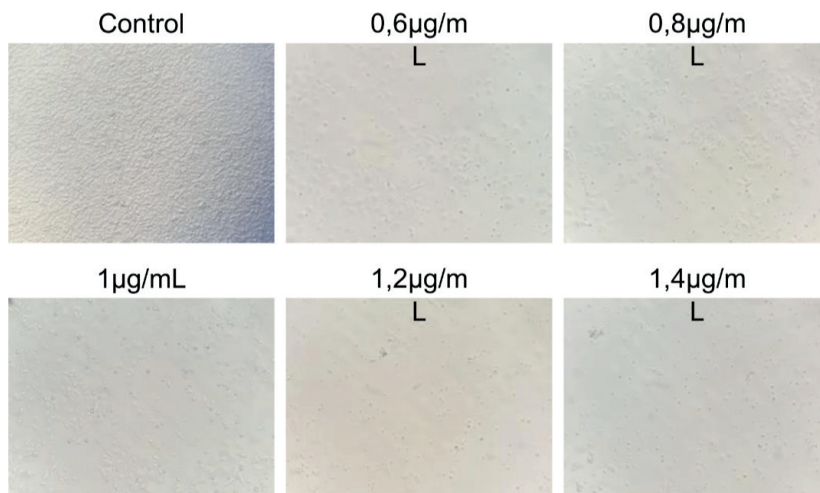


Figura 3. Otimização da concentração de puomicina. Imagem representativa do tratamento de células B16-F0 tratadas com diferentes concentrações de puomicina para a seleção de células transduzidas.

### Transfecção das células HEK293T

Para realizar a transfecção das células HEK293T,  $1,5 \times 10^6$  células foram plaqueadas em duas placas de 10cm. As concentrações dos plasmídeos foram medidas utilizando um nanodrop 2000, e em seguida as quantidades necessárias de cada plasmídeo foram misturadas com PEI que formassem o complexo. Gotejamos lentamente o conteúdo sobre as células HEK293T e incubamos à 37°C. Após 24h, o meio de cultura foi substituído e após mais 24 horas, o sobrenadante contendo o conteúdo viral foi coletado (**Figura 4**).



Figura 4. Imagem representativa de culturas de células HEK293T transfectadas em aumento 10x.



## Transdução das células B16-F0

Para a obtenção das células contendo o vetor vazio (B16F0.EV) e as células nocaute para RASSF9 (B16-F0.R9KO), os respectivos sobrenadantes virais obtidos na etapa de transfecção foram adicionados às células B16-F0. Após 24 horas, as células foram tratadas com o antibiótico de seleção, puomicina ( $1,2\mu\text{g}/\text{mL}$ ), por duas semanas. As células resistentes foram crescidas, congeladas e então seguiu-se para a caracterização das mesmas (**Figura 5**).

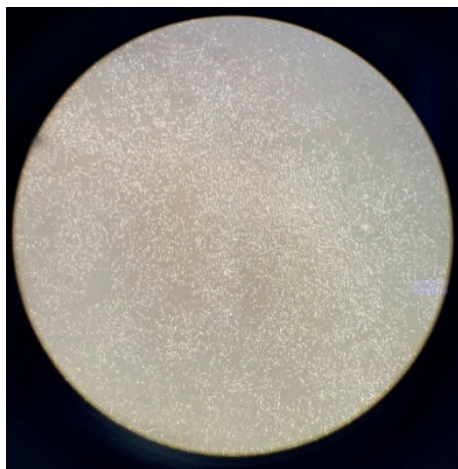


Figura 5. Imagem representativa das células B16-F0 lentivazão em concentração  $1,2\mu\text{g}/\text{ml}$  de puomicina 6 dias após a transdução.

## Níveis de expressão do gene RASSF9 por qPCR

Para a caracterização das linhagens B16-F0, vetor e nocaute, inicialmente os níveis de expressão de RASSF9 foram medidos à nível de RNA por qPCR (**Figura 6**). Esperávamos obter um nível de expressão maior na linhagem B16F0, similar ao nível das B16F0.EV (vetor) e reduzido nas B16F0.R9KO. No entanto, o resultado não ocorreu conforme planejado, possivelmente por troca das amostras já que muitas amostras foram preparadas ao mesmo tempo. Devido a incoerência de resultados, repetimos os experimentos para confirmar os resultados encontrados nas linhagens B16F0, B16F0.Vec, B16F0.R9KO, Tm5, Tm5.Vec e Tm5.R9KO (**Figura 7**). Esperávamos que a expressão das B16F0 fosse similar a expressão da B16F0.Vec mas elas continuaram expressando menos. Iremos repetir os experimentos para confirmar os resultados.

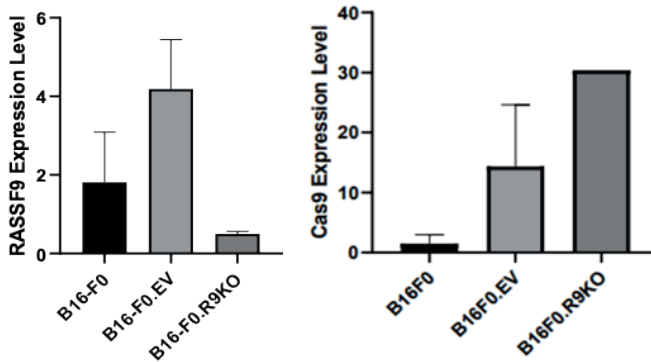


Figura 6. Expressão de RASSF9 nas de melanoma murino B16-F0. Avaliação da expressão relativa de RASSF9 a nível de mRNA por qPCR nas linhagens B16F0, B16F0.EV e B16F0.R9KO.

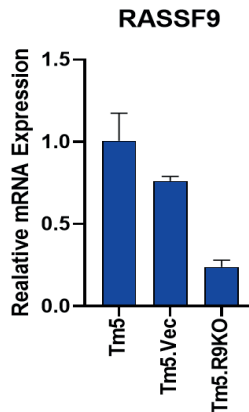


Figura 7. Expressão de RASSF9 em linhagem de melanoma murino Tm5. Avaliação da expressão relativa de RASSF9 a nível de mRNA por qPCR nas linhagens Tm5, Tm5.Vec e Tm5.R9KO.

### Avaliação da depleção de RASSF9 por Western Blot

Seguindo com a caracterização das células B16-F0 e Tm5, realizamos avaliação proteica de RASSF9 e Cas9. Em ambas as linhagens, a expressão do Cas9 foi significativamente elevada tanto nas células vetor quanto nas células nocaute para RASSF9 (**Figura 8 e 9**). No entanto, nas células originais, a expressão do Cas9 foi inexistente. Em relação à expressão de RASSF9, notamos uma redução nas células Tm5, embora não tenha sido completamente eliminada. Isso pode indicar a presença de uma população homogênea. Clones dessas células foram gerados e estão em processo de caracterização. Quanto às células B16-F0, não detectamos qualquer sinal para RASSF9. Portanto, será necessário repetir o Western Blot para finalizar a caracterização dessas células.

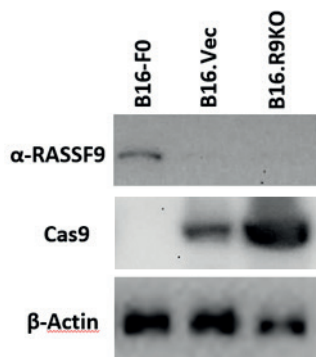


Figura 8. Avaliação da depleção de RASSF9 nas células B16-F0 por Western Blot

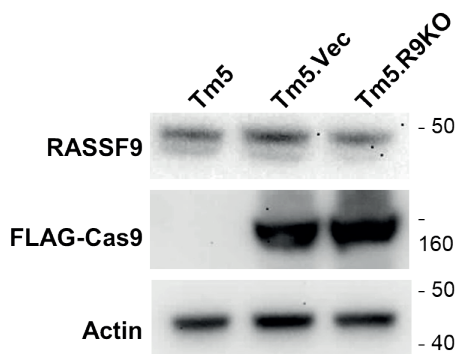


Figura 9. Avaliação da depleção de RASSF9 nas células TM5 por Western Blot

## Ensaio de Crescimento das linhagens em estudo

A capacidade proliferativa das linhagens celulares B16F0, B16F0.Vector e B16F0.R9KO,  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas em placas de 6 poços e contadas após 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas utilizando azul de tripan 0,2% e o contador automático Countess II (Thermo Fisher). Os resultados demonstraram diferenças no crescimento celular entre as células B16-F0 no dia 6 (**Figura 10**).

A linhagem B16F0 registrou um total de 146,3 células, enquanto a linhagem B16F0.Vector apresentou 157,3 células (**Figura 11**). Por outro lado, a linhagem B16F0.R9KO exibiu uma redução no número de células, 76,97 células contadas. Esses resultados indicam que as células nocaute para RASSF9, apresentam redução na capacidade proliferativa.

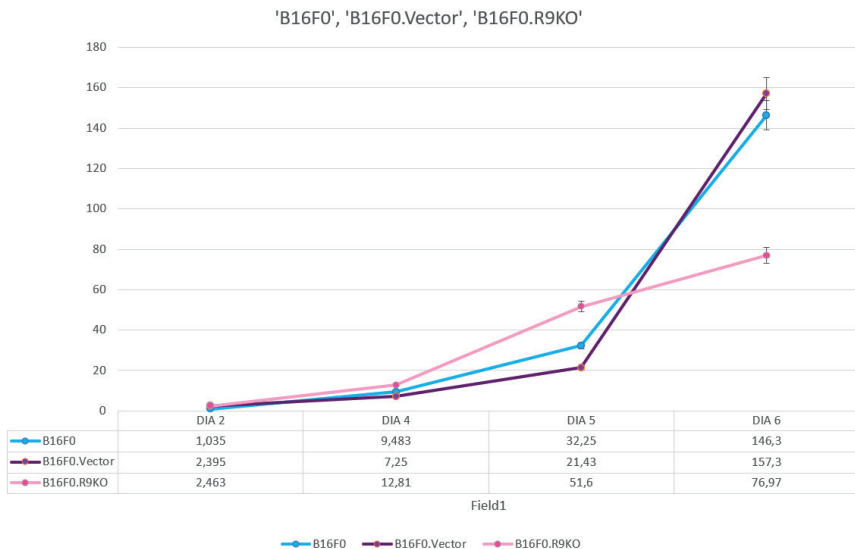


Figura 10. Curva de crescimento das Linhagens B16F0, B16F0.Vector e B16F0.R9KO

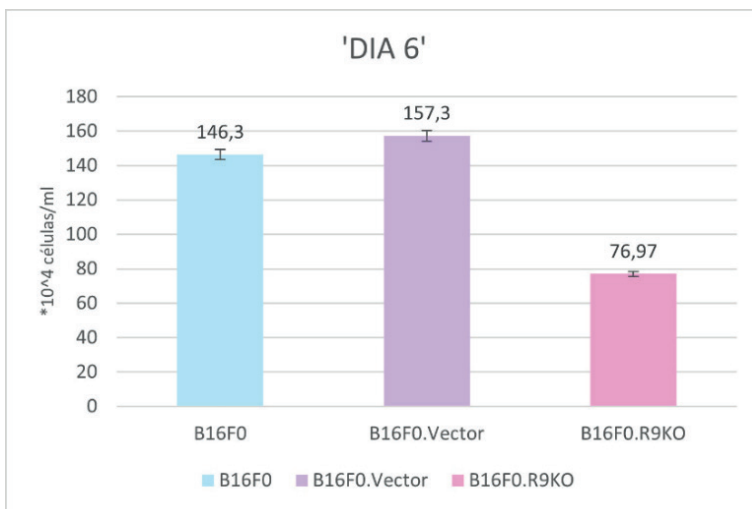


Figura 11. Crescimento das Linhagens B16F0, B16F0.Vector e B16F0.R9KO no Dia 6

## Ensaio de Resistência a Morte com Estaurosporina

A capacidade de resistência a morte celular foi avaliada pela porcentagem de células positivas para Anexina-V, que se liga à fosfatidilserina que são expostas no início do processo de apoptose e Sytox Green, um marcador fluorescente de ácido nucleico que não atravessa as membranas celulares de células viáveis, mas marca facilmente o material genético das células em processo de morte celular.

Assim, as células B16-F0 e Tm5 tratadas com 1 $\mu$ M de estaurosporina por 24 horas e em seguida marcadas com Anexina-V e Sytox Green (**Figura 12**). Os resultados mostram uma possível resistência ao tratamento com estaurosporina nas células Tm5.R9KO. Essas células apresentaram uma maior viabilidade celular em comparação com as células originais e as células vetor. Por outro lado, nas células B16-F0, observamos diferença entre os grupos tratados. Para confirmar esses resultados, serão necessários mais testes com outras drogas, bem como a finalização da caracterização das células nocaute para RASSF9.

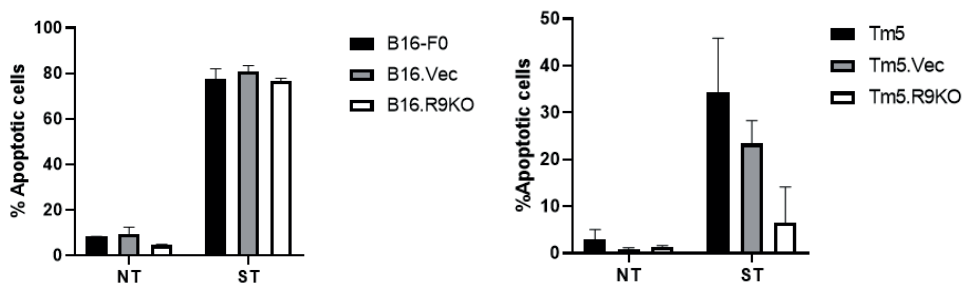


Figura 12. Indução de apoptose por estaurosporina. Gráfico representativo de células B16-F0 e Tm5 após tratamento com estaurosporina (1 $\mu$ M).

## CONCLUSÃO

Embora a caracterização completa das células B16-F0 e Tm5 não tenha sido alcançada, nossos resultados preliminares sugerem uma diminuição nos níveis de RASSF9. Esta diminuição, embora não seja total, parece ter impactado a taxa de proliferação celular. No entanto, curiosamente, essa redução nos níveis de RASSF9 não parece influenciar a resistência das células à morte induzida por estaurosporina. É importante ressaltar que esses resultados ainda são preliminares e não conclusivos. Portanto, serão necessários mais experimentos para confirmar essas observações e elucidar completamente o papel de RASSF9 na proliferação e sobrevivência celular.

## REFERÊNCIAS

AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 2015.

ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the Cell* 6e. [s.l.: s.n.]. v. 6, 2014

ASCIERTO, P. A. et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of translational medicine*, v. 10, p. 85, 2012.

AZOURY, S. C.; LANGE, J. R. *Epidemiology, Risk Factors, Prevention, and Early Detection of Melanoma* Surgical Clinics of North America, 2014.

BALCH, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of Clinical Oncology**, 2009.

BITRA, A. et al. RASSF proteins as modulators of Mst1 kinase activity. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–11, 2017.

BULMAN, A.; NEAGU, M.; CONSTANTIN, C. Immunomics in Skin Cancer - Improvement in Diagnosis, Prognosis and Therapy Monitoring. **Current Proteomics**, 2013.

CHEN, L.; JOHNSON, R. C.; MILGRAM, S. L. P-CIP1, a novel protein that interacts with the cytosolic domain of peptidylglycine  $\alpha$ -amidating monooxygenase, is associated with endosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 50, p. 33524–33532, 1998.

CHUMMUN, S.; MCLEAN, N. R. **The management of malignant skin cancers Surgery (United Kingdom)**, 2017.

COX, A. D.; DER, C. J. Ras history. **Small GTPases**, v. 1, n. 1, p. 2–27, 2010.

Dhanaraman T, Singh S, Killoran RC, et al. RASSF effectors couple diverse RAS subfamily GTPases to the Hippo pathway. **Sci Signal**, 2020

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, n. 15, p. 1869–1883, 2012.

GOLDSTEIN, B. G.; GOLDSTEIN, A. O. **Diagnosis and management of malignant melanoma American Family Physician**, 2001.

GUY, J. B. et al. Evaluation of the cell invasion and migration process: A comparison of the video microscope-based scratch wound assay and the boyden chamber assay. *Journal of Visualized Experiments*, v. 2017, n. 129, p. 56337, 2017.

HAURI, S. et al. Interaction proteome of human Hippo signaling: Modular control of the co-activator YAP1. **Molecular Systems Biology**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2013.

HENNIG, A. et al. Ras activation revisited: Role of GEF and GAP systems. **Biological Chemistry**, v. 396, n. 8, p. 831–848, 2015.

HUTCHINSON, F.; CANCER, S.; ALLIANCE, C. Treatment of Metastatic Melanoma : An Overview - Cancer Network Treatment of Metastatic Melanoma : An Overview Treatment of Metastatic Melanoma : An Overview - Cancer Network. **Network**, v. 23, n. 6, p. 1–7, 2010.

IGLESIAS GÃ3MEZ, J. C.; MOSQUERA ORGUEIRA, A. An Integrative Analysis of Meningioma Tumors Reveals the Determinant Genes and Pathways of Malignant Transformation. **Frontiers in Oncology**, v. 4, n. June, p. 1–12, 2014.

JIANG, C. et al. Application of CRISPR/Cas9 gene editing technique in the study of cancer treatment *Clinical Genetics*. **Blackwell Publishing Ltd**, 2020.

KITA, R.; FRASER, H. B. Local Adaptation of Sun-Exposure-Dependent Gene Expression Regulation in Human Skin. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 10, p. 1–18, 2016.

- LEE, C. M. et al. A novel role of RASSF9 in maintaining epidermal homeostasis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.
- LEE, SH., Meng, X., Flatten, K. *et al.* Phosphatidylserine exposure during apoptosis reflects bidirectional trafficking between plasma membrane and cytoplasm. **Cell Death Differ** **20**, 64–76, 2013.
- LI, B. et al. MicroRNA-1254 exerts oncogenic effects by directly targeting RASSF9 in human breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 53, n. 5, p. 2145–2156, 2018.
- LI, W.; MELTON, D. W. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 31, n. 19, p. 2412–2422, 2012.
- MANUSCRIPT, A. NIH Public Access. v. 11, n. 11, p. 761–774, 2013.
- MERLINO, G. et al. The state of melanoma: challenges and opportunities. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 29, n. 4, p. 404–416, 2016.
- MILLER, R. P. et al. **Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity Toxins**, 2010.
- RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 2013.
- RIEDL, A. et al. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 1, p. 203–218, 2017.
- SÁNCHEZ-SANZ, G. et al. MST2-RASSF protein-protein interactions through SARAH domains. **Briefings in Bioinformatics**, v. 17, n. 4, p. 593–602, 2016.
- SÁNCHEZ-TOMÉ, E. et al. Genome-wide linkage analysis and tumoral characterization reveal heterogeneity in familial colorectal cancer type X. **Journal of Gastroenterology**, v. 50, n. 6, p. 657–666, 2015.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews Disease Primers**, n. April, p. 15003, 2015.
- SCHADENDORF, D.; KOCHS, C.; LIVINGSTONE, E. Handbook of 96 Cutaneous Melanoma. p. 13–28, 2013.
- SHALEM, O. et al. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. **Science**, v. 343, n. 6166, p. 84–87, 2014.
- SHERWOOD, V. et al. RASSF7 Is a Member of a New Family of RAS Association Domain – containing Proteins and Is Required for Completing Mitosis. v. 19, n. April, p. 1772–1782, 2008.
- Shi H, Ju Q, Mao Y, et al. TAK1 Phosphorylates RASSF9 and Inhibits Esophageal Squamous Tumor Cell Proliferation by Targeting the RAS/MEK/ERK Axis. **Adv Sci (Weinh)**. 2021
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.



TSAO, H. et al. Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs American Academy of Dermatology Ad Hoc Task Force for the ABCDEs of Melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 4, p. 717–723, 2015.

VAVVAS, D. et al. Identification of Nore1 as a potential Ras effector. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5439–5442, 1998.

VORA, N. Melanoma and BRAF. v. 600, p. 6–9, 2014.

Yuan, J., Ju, Q., Zhu, J. *et al.* RASSF9 promotes NSCLC cell proliferation by activating the MEK/ERK axis. *Cell Death Discov.* **7**, 199 (2021).

ZHENG, X. et al. The coiled-coil domain of oncogene RASSF 7 inhibits hippo signaling and promotes non-small cell lung cancer. v. 8, n. 45, p. 78734– 78748, 2017.

ZHANG, P. et al. ASPP1 / 2-PP1 complexes are required for chromosome segregation and kinetochore-microtubule attachments. v. 6, n. 39, [s.d.].