

Michelle dos Santos Menezes

**Papel do jaspamídeo na dinâmica do
citoesqueleto de actina das
células de melanoma:
relação com migração e invasão**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo
2011**

Michelle dos Santos Menezes

**Papel do jaspamídeo na dinâmica do
citoesqueleto de actina das
células de melanoma:
relação com migração e invasão**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Maria
Machado Santelli

Versão original

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Menezes, Michelle dos Santos.

Papel do jaspamídeo na dinâmica do citoesqueleto de actina das células de melanoma: relação com migração e invasão / Michelle dos Santos Menezes. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Gláucia Maria Machado Santelli.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia da Célula Tumoral.

Versão do título para o inglês: The role of jaspamide in the actin cytoskeleton of melanoma cells: the relation between migration and invasion.

Descritores: 1. Melanoma 2. Jaspamídeo 3. Migração 4. Invasão 5. Metástase I. Santelli, Gláucia Maria Machado II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0161/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Michelle dos Santos Menezes.

Título da Dissertação: Papel do jaspamídeo na dinâmica do citoesqueleto de actina das células de melanoma: relação com migração e invasão.

Orientador(a): Gláucia Maria Machado Santelli.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

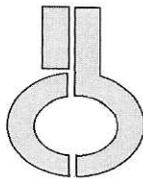
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 309/09, referente ao projeto intitulado: "*Papel do Jaspamídeo na dinâmica do citoesqueleto de actina das células de melanoma: relação com migração e invasão*" sob a responsabilidade de **Michelle dos Santos Menezes**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 15 de maio de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus queridos pais Jeanne e Paulo que são
a base para tudo que sou e construo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Glaucia Maria Machado Santelli pela orientação, paciência e eterna boa vontade e carinho nas explicações.

Ao Prof. Dr. Ruy G. Jaeger pela orientação didática durante o plano PAE, pelos conselhos científicos e pela gentil disponibilização dos equipamentos de seu laboratório.

À Profa. Dra. Marinilce Fagundes do Santos por ter cedido gentilmente os inibidores utilizados neste trabalho.

À Profa. Dra. Vanessa Morais Freitas por ter me ajudado e ensinado técnicas essenciais nesse trabalho.

À Profa. Dra. Marisa Ionta pelos conselhos acadêmicos e por ser uma grande amiga para todas as horas.

Ao Roberto Cabado pelo cuidado e dedicação na obtenção de imagens, além das infinitas conversas na sala do microscópio.

À Dona Nancy que fez do nosso caos uma organização gentil de vó. Sem a senhora nada é igual.

A Celiana por ter me dado as informações necessárias para o decorrer deste trabalho, sempre com calma e bom humor.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB-I pela eficiência e prontidão com as quais me atenderam.

À minha mãe que nunca me faltou em nenhuma situação. À mulher que me ensinou o que é ser forte e como se deve encarar a vida e as dificuldades. À minha rocha e meu eterno porto seguro, muito obrigada.

Ao meu pai que sempre foi exemplo de pessoa e profissional. Ao homem que sempre está comigo, de uma maneira ou de outra, me mostrando a calma e a racionalidade necessárias para seguir o caminho. Estaremos sempre juntos.

Ao Fernando por estar sempre comigo, nos momentos bons e ruins. Por me deixar chorar quando eu precisava e por saber quando enxugar minhas lágrimas. Por rir comigo e por me acompanhar nos muitos finais de semana passados no

laboratório. Por tudo que foi e que ainda temos pela frente. Muito obrigada pelo amor que me dedica e com que sempre me trata.

Ao Matheus, meu grande amigo e irmão de longa data. Você sempre vai fazer parte de tudo o que eu faço porque sempre fará parte da minha vida.

À Paula, uma grande cientista e professora que me ajudou a ser uma profissional melhor através do seu exemplo e das suas explicações.

Ao Fábio que estava sempre pronto a ajudar e a ouvir meu desabafo.

Ao Adam, um moço chiquíssimo que me ajudou todas as vezes que eu precisei, mesmo quando eu não soube pedir, e que sempre teve a sensibilidade de dizer o que precisava ser dito.

À Marinão que sofre comigo todos os dias as mesmas “desgraças”. À pessoa que nunca pensou antes de me oferecer conforto e de estender a mão nos piores momentos.

À Camila pelas eternas conversas, risadas e caronas. Por sempre ter me ouvido e dado atenção como só uma amiga de verdade faz. Obrigada pelos conselhos e por todas as vezes que me fez rir.

À Natalia por ser sempre uma luz de alegria me ajudando a ver o melhor lado das coisas. Obrigada por todos os dias em que você fez com que eu me sentisse melhor.

À Raquel por estar sempre pronta a me ouvir e a gritar comigo. Por estar sempre na hora e no local exatos para um abraço e uma risada. Obrigada por ser meu exemplo de determinação e coragem.

À Amandita que sempre será a voz da razão dentro deste laboratório. À pessoa que consegue como ninguém ser meiga e forte ao mesmo tempo. Obrigada a me ensinar a ser uma pessoa melhor.

Ao Mingau pelas canções e pelo bom humor diários.

Ao Marcel pelas boas conversas e pelas ótimas marmitas que eu sempre roubava um pouquinho.

À Bia por ser sempre tão meiga e por estar sempre pronta a ver o melhor lado das piores tragédias. Obrigada por concordar comigo todas as vezes que eu reclamei.

À Luciana e ao Humberto que não me deixaram esquecer o que é ser um aluno de iniciação científica descobrindo ciência. Muito obrigada pelo apoio.

À Luana por ser sempre uma pessoa tão cheia de vida e com sorriso no rosto. Obrigada pelo seu eterno interesse em aprender e ouvir.

Ao Jonatão, por tudo, sempre! Pelo café, pelo apoio moral, pela ajuda a qualquer hora e a qualquer momento. Por ser sempre tão gentil, carinhoso e atencioso com todos. Por colocar um sorriso no meu rosto mesmo quando parecia impossível. Obrigada também por bagunçar a nossa bancada; “brigar” com você era uma das melhores partes do dia!

Ao Evandro que estava sempre pronto a me ouvir e a me ajudar. À pessoa que sempre foi uma grande companheira para todas as horas. Obrigada pelas risadas no trânsito e no laboratório. Obrigada por me oferecer um ombro amigo, mesmo quando eu deixava as lágrimas estampadas nele.

Ao Emerson e à Camila, meus grandes amigos do andar de cima. Sem vocês as disciplinas e as dificuldades da vida acadêmicas seriam insuportáveis! Obrigada por partilhar as experiências e emoções do ICB.

A todas as Gordas Afobadas que fizeram de mim uma pessoa melhor e mais feliz durante a graduação: Érica, Paula, Aryanna, Mariana, Ana, Priscila e Lys. Agradeço também aos amigos Bruno, Rodrigo, Maíra e Babi. Sem vocês a graduação não teria sido tão maravilhosa quanto foi.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Não sei como pareço aos olhos do mundo, mas eu mesmo vejo-me como um pobre garoto que brincava na praia e se divertia em encontrar uma pedrinha mais lisa uma vez por outra, ou uma concha mais bonita do que de costume, enquanto o grande oceano da verdade se estendia totalmente inexplorado diante de mim.”

Isaac Newton

RESUMO

MENEZES, M. S. **Papel do jaspamídeo na dinâmica do citoesqueleto de actina das células de melanoma**: relação com migração e invasão. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Diversos mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos no processo de metástase, sendo que os movimentos de migração e invasão tem um papel essencial. Em ambos os processos o papel dos microfilamentos é de grande importância, tanto para a migração mesenquimal, agindo principalmente na formação das protrusões de membrana, quanto na migração ameboide cujo papel principal é o da contração celular. Neste contexto, o presente trabalho foi analisar os efeitos da droga jaspamídeo que possui conhecidas propriedades anti-polimerizantes dos filamentos de actina. Após a determinação das concentrações de IC50 para as linhagens HT144 e NGM foram estudados os efeitos da droga através de ensaios de feridas, ensaios de migração em placas de *transwell* e invasão com câmara de Boyden, citoquímica fluorescente, imunofluorescência e *Western blotting*. Os tratamentos mostraram que o fármaco atua desorganizando o citoesqueleto de modo dependente de sua concentração, levando ao acúmulo de F-actina na região perinuclear. Os ensaios de ferida mostraram diminuição da taxa de fechamento da área livre após os tratamentos e os ensaios de migração com placas de *transwell* mostraram que os grupos tratados sofrem aumento da migração provavelmente pela mudança de estratégia de movimentação, que passaria de mesenquimal para ameboide. A diminuição da expressão da proteína IRSp53 por estas células corrobora este dado. Nos ensaios de invasão com câmara de Boyden o tratamento mostrou-se efetivo apenas para a célula NGM quando tratadas com 75 nM de jaspamídeo e 30 μ M de Y-27632. Quanto à migração, a linhagem NGM não completava este processo quando tratada com as concentrações do IC50 e do IC50/2 acrescido de Y-27632 e a linhagem HT144 apresenta aumento deste parâmetro quando tratado com jaspamídeo e 200 μ M de NSC23766.

Palavras-chave: Melanoma. Jaspamídeo. Migração. Invasão. Metástase.

ABSTRACT

MENEZES, M. S. **The role of jaspamide in the actin cytoskeleton of melanoma cells:** the relation between migration and invasion. 2011. 77 p. Masters Thesis (Tissue and Cell Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Many signaling ways are involved in metastasis, and the cellular migration and invasion are very important in this context. The role of microfilaments is essential in mesenchymal migration, where it acts in the formation of membrane protrusions, and amoeboid migration, where they play a key role in cell contraction. In this context, the present work aimed to analyze the effects of the drug jaspamide, which has well-known properties on cytoskeleton (anti-polymerizing of the actin microfilaments). After the determination of the IC₅₀ concentrations for the HT144 and NGM cell lines, the effects of the treatment with jaspamide were studied through wound assays, *transwell* assays, Boyden's chamber assays, fluorescent cytochemistry, immunofluorescence and *Western blotting*. The treatments demonstrated the drug acts disorganizing the actin cytoskeleton in a dose-dependent manner, leading the accumulation of F-actin in the perinuclear region. The wound assays indicated a decrease in the free area after the treatments, and the migration assays with *transwell* showed that, after the inoculation with the drug, the cells increased the process of migration, which can be explained by the switch of their migration strategy. This fact was corroborated by the decreased expression of the IRSp53 protein. In the invasion assays with Boyden's chamber, the treatment with jaspamide was effective only in NGM cells, when they are treated with 75 nM of the drug plus 30 μ M of Y-27632. Regarding the migration process, the NGM cell line did not show movement when treated with the IC₅₀ concentration and the IC₅₀/2concentration plus Y-27632, and the HT144 cell line increases this parameter when treated with jaspamide and 200 μ M of NSC23766.

Key words: Melanoma. Jaspamide. Migration. Invasion. Metastasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Curvas de crescimento das linhagens NGM e HT144.....	32
Figura 2 – Histograma do número de células contadas por citometria de fluxo após o tratamento com jaspamídeo para a verificação do valor de IC50.....	33
Figura 3 – Gráficos de índice apoptótico medido através de citometria de fluxo.....	34
Figura 4 – Histograma de índice apoptótico medido através de citometria de fluxo.....	36
Figura 5 – Gráficos de viabilidade celular medida em citometria de fluxo.....	38
Figura 6 – Histogramas de viabilidade celular medida em citometria de fluxo.....	39
Figura 7 – Citoquímica fluorescente dos filamentos de actina das linhagens NGM e HT144.....	41
Figura 8 – Fotomicrografias dos ensaios de feridas das células NGM tratadas com 150 nM de jaspamídeo.....	43
Figura 9 – Fotomicrografias dos ensaios de feridas das células NGM tratadas com 75 nM de jaspamídeo.....	44
Figura 10 – Fotomicrografias dos ensaios de feridas das células HT144 tratadas com 100 nM de jaspamídeo.....	45
Figura 11 – Fotomicrografias dos ensaios de feridas das células HT144 tratadas com 50 nM de jaspamídeo.....	46
Figura 12 – Histogramas de taxa de migração em ensaios de ferida.....	48
Figura 13 – Histogramas de taxa de migração e invasão em ensaios em placas de <i>transwell</i>	50
Figura 14 – Imunofluorescências da proteína MT1-MMP para as linhagens NGM e HT144.....	52
Figura 15 – Ensaios de <i>Western blotting</i> para as proteínas β -tubulina, IRSp53 e MT1-MMP.....	53
Figura 16 – Histogramas de taxa de migração e invasão em ensaio de placas de <i>transwell</i> com inibidor da proteína Rac.....	55
Figura 17 – Histogramas de taxa de migração e invasão em ensaio de placas de <i>transwell</i> com inibidor da proteína ROCK.....	57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1**– Distribuição da frequência de células vivas, mortas por apoptose inicial, mortas por apoptose tardia e mortas por necrose nas linhagens NGM e HT144 após tratamento com jaspamídeo.....35
- Tabela 2** - Distribuição da frequência de células viáveis e inviáveis nas linhagens NGM e HT144 após tratamento com jaspamídeo37
- Tabela 3** – Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de placas de *transwell* utilizando inibidores de Rac e ROCK após o tratamento com jaspamídeo por 48 h nas linhagens NGM e HT144.64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Invasão e migração celular	18
1.2 Proteínas reguladoras do citoesqueleto	20
1.3 Jaspamídeo	22
2 OBJETIVOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Linhagens celulares, condições de cultivo e tratamento	26
3.2 Jaspamídeo	26
3.3 Citometria de fluxo	26
3.4 Ensaio de ferida (<i>Wound assay</i>)	27
3.5 Citoquímica fluorescente	27
3.6 Ensaio de Migração em Placas de <i>Transwell</i>	28
3.7 Ensaio de Invasão em Câmara de Boyden	28
3.8 <i>Western blotting</i>	29
3.9 Imunofluorescência	30
3.10 Ensaio de viabilidade (<i>ViaCount</i>)	30
3.11 Ensaio de detecção de morte apoptótica (Anexina-V FITC x Iodeto de Propídeo)	30
3.12 Inibidores de Rac e ROCK	31
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que envolve mutações dinâmicas no genoma que podem ocorrer em duas classes de genes: em oncogenes (ganho dominante de função) e em genes supressores de tumor (perda recessiva de função) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Segundo Hanahan e Weinberg (2011), esta enfermidade tem características específicas de origem molecular, bioquímica e celular compartilhadas pela maioria dos tipos de cânceres humanos.

Uma série progressiva de modificações genéticas (que variam desde mutações pontuais a alterações cromossômicas) leva células normais a adquirirem características invasivas inerentes a esta doença (FOULDS, 1954). Dentre estas características que coletivamente orquestram o crescimento maligno podem ser citadas a capacidade de produzir independentemente sinais de crescimento para o tumor, intensa produção de sinais anti-crescimento para o tecido hospedeiro, evasão dos sinais de morte celular programada, capacidade ilimitada de proliferação, angiogênese, invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A origem da metástase pode ser explicada por um modelo integrado das hipóteses existentes sobre o assunto que consiste na crença de que a grande tendência à disseminação existente nas células metastáticas pode ser adquirida durante o progressivo aumento da agressividade do tumor primário (ao mesmo tempo em que ocorre uma seleção advinda das características do tecido hospedeiro) como também das células que possuem uma constituição genética favorável ao processo de metástase (NGUYEN; MASSAGUÉ, 2007). Esta seleção pode ocorrer tanto pelo fato de que os tumores são heterogêneos e possuem células que teriam sobrevivido ao transporte e à colonização de outro tecido devido as suas vantagens de crescimento (CHIANG; MASSAGUÉ, 2008) quanto pelo fato de que certos tumores primários possuem genes relativos à facilitação da metástase (RAMASWAMY et al., 2003).

Diversos mecanismos celulares e moleculares estão envolvidos no processo de metástase (GRÜNERT et al., 2003), dentre eles a sinalização entre as células tumorais e o tecido hospedeiro, a transição epitélio-mesenquimal, a angiogênese, a evasão ao sistema imune (FIDLER, 2003) e a transição epitélio-ameboide (BINAMÉ et al., 2010). O microambiente do estroma no qual as células tumorais se desenvolvem influencia profundamente a progressão tumoral através da sinalização

parácrina entre as células tumorais epiteliais e os fibroblastos do estroma ao redor do tumor, já que estes secretam não só fatores de crescimento como também citocinas e metaloproteinases de matriz, entre outras moléculas importantes no desenvolvimento dos carcinomas (ELENBAAS; WEINBERG, 2001). Fatores positivos (como as metaloproteinases e os fatores de crescimento) atuam em conjunto com fatores negativos (como a trombospondina, angiostatina e p53) no microambiente tumoral, que é constituído pelas próprias células de câncer (FOLKMAN, 1995) e pelas células do estroma adjacente (ELENBAAS; WEINBERG, 2001). Ambos são secretados por este ambiente, sendo que os fatores negativos tem sua expressão reduzida nas células de câncer (ELENBAAS; WEINBERG, 2001).

Contribuem também para a metástase as transições epitélio-mesenquimal e epitélio-ameboide, já que esses processos fazem com que as células epiteliais adquiram características fenotípicas que contribuem para a disseminação das células tumorais para outros tecidos (GRÜNERT et al., 2003). Na transição epitélio-mesenquimal observa-se a mudança de formato celular para fibroblastóide, capacidade migratória elevada, perda de polaridade e redução/redistribuição de marcadores epiteliais. Já na transição epitélio-ameboide, além das mudanças supracitadas, ocorre também a diminuição dos contatos célula-célula e da interação com a matriz extracelular, fazendo com que a célula adquira morfologia mais arredondada (BINAMÉ et al., 2010).

Outro fator de grande influência na tumorigênese e metástase é a inflamação, que quando crônica pode ser associada ao aparecimento de neoplasias (CORDON-CARDO; PRIVES, 1999). Isto se deve ao papel de algumas quimiocinas que promovem o crescimento e a metástase do tumor através do aumento de sua capacidade de proliferação, migração e neovascularização (WANG et al., 1998).

Entre os cânceres mais agressivos e de pior prognóstico estão aqueles que apresentam grande capacidade de migração celular (GAVA et al., 2006) e a consequente formação de metástase, como é o caso dos melanomas. Na epiderme humana normal, os melanócitos encontram-se na camada basal da epiderme e nos folículos pilosos (SLOMINSKI et al., 2004) associados aos queratinócitos na proporção de aproximadamente 1:36, formando uma unidade funcional denominada unidade melano-epidérmica (FITZPATRICK; BREATHNACH, 1963; JIMBOW et al., 1976), ou unidade epidermal de melanina (KINCANNON, 1999) que em condições normais determinam se os melanócitos estão quiescentes, proliferando ou morrendo

(BISSELL; RADISKY, 2001). Cada melanócito epidermal secreta melanossomos para seus respectivos queratinócitos (KINCANNON, 1999), e distúrbios nesse equilíbrio poderiam desencadear a tumorigênese levando à formação de um melanoma.

A maioria dos casos dessa doença enquadra-se em quatro tipos: melanoma acral lentiginoso, melanoma de espalhamento superficial, melanoma lentigo maligno e melanoma maligno nodular. Os dois primeiros têm padrões de crescimento radial seguido por crescimento vertical, geralmente associado com a metástase (CLARK et al., 1975; SU, 1997). O tipo lentigo tem margens irregulares e geralmente ocorre em áreas da pele de pessoas idosas que sofrem grande insolação. O tipo acral lentiginoso ocorre nas mãos e pés, demonstrando grande capacidade de invasão quando apresenta crescimento vertical. Entre a população caucasiana o tipo mais freqüente é o de espalhamento superficial, que ocorre na maioria das vezes nas extremidades e tronco apresentando lesões de cores variadas. Já o tipo nodular apresenta crescimento acelerado e forte pigmentação (SU, 1997).

Além dos tumores malignos é muito comum a formação de tumores pigmentares benignos chamados nevos, formados pela proliferação de melanócitos na junção dermo epidérmica. Quando congênito este tumor de tamanho e forma variáveis chega a apresentar uma taxa de transformação maligna de 10 a 20% (NETO; CUCÉ, 2001). Geralmente de tonalidade marrom, os nevos pigmentares originam-se de melanócitos pré-existentes ou de nevomelanoblastos, que são melanócitos advindos da crista neural que migram para a epiderme ou derme (local onde se diferenciam) (HOLBROOK et al., 1989).

Alguns nevos são displásicos com melanócitos morfologicamente atípicos, podendo receber diferentes nomenclaturas de acordo com sua localização. É denominado juncional quando ocorre proliferação melanocítica restrita à epiderme, além de apresentar acastanhada e uniforme, ou tonalidade mais proeminente no centro e esmaecimento gradual para as bordas. Quando denominado composto, caracteriza-se pela pigmentação central homogênea ou em glóbulos e pontos castanhos, pretos ou azul-acinzentados, sendo que algumas lesões desse tipo podem apresentar pontos de hipopigmentação de aspecto regular e central. Por fim, é chamado de intradérmico quando não possui rede pigmentar, presença de glóbulos e pontos, podendo ter aspecto nodular formado por glóbulos com pouca pigmentação ou tonalidade semelhante a pele normal (REZZE et al., 2006).

A formação dos cânceres de pele está normalmente associada à exposição à radiação ultravioleta (UV) (ARMSTRONG; KRICKER, 2001; VEIEROD et al., 2010) pois sabe-se que células pigmentadas (com melanina) apresentam comportamento diferente das não-pigmentadas após exposição à radiação, sendo que a melanina pode tanto diminuir os principais danos causados no DNA pela UV (KOBAYASHI et al., 1993; SMIT et al., 2001) como gerar espécies reativas de oxigênio capazes de danificar esta molécula (HILL; HILL, 2000; KOCH; CHEDEKEL, 1986).

Sendo assim, o melanoma é de grande importância, pois sua incidência cresceu 1,3% na população norte americana entre os anos de 1999 e 2000 (WERARATNA et al., 2002). No Brasil, o câncer de pele corresponde a 25% dos tumores malignos registrados, e apesar de melanomas representarem apenas 4% das neoplasias malignas da pele eles são considerados mais graves por possuírem maiores chances de formar metástases (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2010). Apesar de décadas de estudos, melanomas metastáticos não possuem tratamento efetivo e o período de sobrevivência de pacientes com este problema gira em torno de 6 a 10 meses (JEMAL et al., 2006; SOENGAS; LOWE, 2003). Em 2008, 1.303 pessoas morreram devido à doença e quase 6.000 novos casos foram estimados para o ano de 2010 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2010). Este tipo de neoplasia é considerado o mais agressivo dos cânceres de pele (GAVA et al., 2006), e os tratamentos atuais não demonstram grande eficácia além de não serem eficientes na prevenção da metástase.

1.1 Invasão e migração celular

A invasão de células cancerígenas ao tecido circundante é um processo comum na progressão tumoral e um passo inicial para a metástase. Este fenômeno requer o início da migração celular, fenômeno que envolve a polimerização de actina. No processo de invasão celular as células tumorais migram para o compartimento estromal, onde tem livre acesso aos vasos sanguíneos e linfáticos. Ao penetrar nas paredes dos vasos (processo chamado de intravasão) estas células são carregadas pelo sistema circulatório para locais distantes. Ao ficarem presas a capilares as células tumorais escapam e penetram no tecido circundante, um fenômeno chamado de extravasamento, que pode ocorrer de diferentes maneiras (através da proliferação dentro do lúmen do vaso ou forçando mecanicamente as

células do endotélio, possivelmente degradando-o, num processo similar à diapedese) (VIGNJEVIC; MONTAGNAC, 2008).

A migração é um processo que ocorre em condições fisiológicas, ocorrendo na morfogênese embriológica, no tráfego de células do sistema imune, e na cicatrização, como também em processos patológicos, fazendo parte dos eventos necessários para a metástase tumoral. Esse processo pode ser dividido em dois grandes grupos: a migração coletiva e a individual, ambas podendo ocorrer simultaneamente na maioria dos tipos de tumores (FRIEDL; WOLF, 2003).

A migração coletiva tem três principais características: as células permanecem física e funcionalmente conectadas, já que suas junções célula-a-célula permanecem intactas, o citoesqueleto de actina gera a organização supracelular e a polaridade necessárias para a geração da tração e força protrusiva para o movimento, e por último a modificação estrutural do tecido ao longo da migração, com o objetivo de eliminar obstáculos do caminho ou para deposição de uma nova membrana basal (conhecida como modificação secundária da matriz extracelular) (FRIEDL; GILMOUR, 2009).

Na migração individual, por sua vez, as células de origem de um compartimento multicelular como o epitélio perdem os contatos celulares para se movimentar e dessa forma encaminhar-se para o tecido conjuntivo adjacente, processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal. Dependendo das condições ambientais, os tumores também podem passar por uma transição epitélio-ameboide, delimitando um tipo diferente de migração (FRIEDL; WOLF, 2003).

No processo de migração mesenquimal destaca-se o papel da organização da rede de actina filamentosa e a formação das adesões célula-matriz em resposta à matriz extracelular que são controladas pelas pequenas GTPases da família Rho (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002; YAMASAKI et al., 2005). Este tipo de movimento celular, fundamental para a metástase, possui diversas etapas altamente integradas. A etapa inicial é a protrusão da membrana plasmática. As estruturas protrusivas formadas por células que estão migrando e/ou invadindo são chamadas de filopódios, lamelipódios e invadopódios, dependendo das suas características morfológicas, estruturais e funcionais. A formação dessas estruturas é controlada pela polimerização dos filamentos da actina na periferia da célula (BAILLY; CONDEELIS, 2002; CONDEELIS et al., 2005; YAMAGUSHI; CONDEELIS, 2007).

Já na migração ameboide, observa-se que a propulsão para o movimento é dada pela pressão hidrostática gerada pela formação de *blebs* na membrana e pela contração das fibras corticais de actina controlada pela quinase da cadeia leve de miosina (MLCK – *Myosin Light Chain Kinase*) (BINAMÉ et al., 2010). Neste tipo de movimento celular não há o envolvimento das integrinas na formação de adesões ao substrato (que, portanto, são mais fracas) nem da contração das fibras de *stress* (BINAMÉ et al., 2010).

1.2 Proteínas reguladoras do citoesqueleto

O citoesqueleto de actina e suas proteínas reguladoras tem um marcante papel em diferentes etapas na invasão/metástase (VIGNJEVIC; MONTAGNAC, 2008) que envolve a coordenação de dois processos: a adesão celular e a interação proteolítica com os substratos da matriz extracelular, que resulta na degradação e remodelação das barreiras do tecido intersticial, além da degradação proteolítica da matriz extracelular. Durante a progressão tumoral e consequente metástase várias classes de enzimas são ativadas e super-expressas, incluindo as metaloproteinases de matriz, as serino proteases e as catepsinas (WOLF et al., 2003). Neste contexto destaca-se o papel da MT1-MMP (metaloproteinase de matriz de membrana do tipo 1), que está intimamente relacionada não só com a migração mesenquimal (onde tem maior participação no processo) como também na migração ameboide (onde é pouco utilizada quando comparada com o processo anterior) (KURISO; TAKENAWA, 2009). Esta proteína que está ligada à membrana plasmática tem uma série de substratos específicos (incluindo colágenos dos tipos I, II e III, além da fibronectina e das lamininas 1 e 5) e muitas funções (onde figuram as modificações proteolíticas em CD44, integrina αv e transglutaminase, além de exercer efeitos reguladores na migração celular). A presença de agregados funcionais de MT1-MMP, actina e cortactina (proteína que age na formação e estabilização dos filamentos de actina) nas protrusões de membrana na frente de migração é necessária para que a célula possa degradar a matriz extracelular durante a invasão (ARTYM et al., 2006).

A actina apresenta-se em grande concentração no interior do citoplasma, sendo uma das proteínas mais abundantes do planeta. Isto se deve ao fato de que os microfilamentos participam de uma série de eventos e estruturas servindo de arcabouço para a determinação do formato da célula, força de contração para a

citocinese durante as divisões celulares e para a formação das adesões focais e protrusões de membrana durante os movimentos celulares (POLLARD; COOPER, 2010). A mobilidade celular requer a reorganização coordenada dos filamentos de actina e dos microtúbulos, sendo que estes atuam na manutenção da polaridade celular durante a movimentação (SCHOBER et al., 2009), já que o centróssomo localiza-se entre o núcleo e a frente de migração (BINAMÉ et al., 2010).

O grupo de Ballestrem et al. (2000) mostrou o envolvimento da polimerização da F-actina e dos microtúbulos na mobilidade e migração das células de melanoma murino B16, ressaltando o papel das fibras de actina na formação e controle da protrusão lamelar. Utilizando esta mesma linhagem celular, além das linhagens B16F1 e B16F10, Kuriso (2005) e seu grupo estudaram o papel das proteínas WAVE (*WASP-family verprolin-homologous proteins*) no processo de formação das protrusões celulares durante a invasão *in vitro* e metástase *in vivo*.

A família de proteínas WAVE foi descrita e identificada a partir de estudos relacionados com a Síndrome de Wiskott-Aldrich, sendo que o primeiro polipeptídeo desta classe foi a WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) que é expressa somente em células hematopoiéticas. Esta família ainda tem mais quatro membros: a N-WASP e as três proteínas WAVE, que ainda carregam um domínio de verprolina que não é encontrado nos demais polipeptídeos. A proteína N-WASP é expressa ubiquamente no organismo, mas encontra-se em maior concentração no tecido cerebral. Já as proteínas WAVE1 e 3 são expressas em grande quantidade no cérebro e em pequena quantidade nas células hematopoiéticas. Já a proteína WAVE2, que está relacionada com a migração de células de melanoma, é expressa ubiquamente (KURISO; TAKENAWA, 2009).

A proteína WAVE2 está sempre ativa e a modulação de sua atividade se faz através de outras proteínas que formam um complexo regulatório (DERIVERY; GAUTREAU, 2010). Dentre as proteínas deste complexo encontra-se a IRSp53, que interage com a molécula supracitada através de seu domínio SH3 recrutando e ativando o complexo WAVE2 na membrana celular, promovendo assim a formação de lamelípódios para a migração mesenquimal (DERIVERY; GAUTREAU, 2010).

Sabendo que Rac1 ativa a polimerização da actina através dos complexos das proteínas WAVE e do complexo Arp2/3 levando à formação de protrusões de membrana que empurram esta estrutura para a direção do movimento das células, o grupo de Kuriso (KURISO et al., 2005) silenciou o gene da proteína WAVE2 (entre

outros) mostrando seu papel decisivo no controle da polimerização do citoesqueleto de actina de células de melanoma murino e sua relação com a metástase.

Em seu trabalho este grupo viu que a diminuição da concentração citoplasmática dessa proteína reduziu a capacidade de invasão e metástase das células supracitadas. Além disso, o complexo da proteína WAVE2 tem um papel importante na migração ameboide, uma vez que ela é responsável pelo bloqueio da sinalização da proteína RhoA que controla este tipo de movimentação celular (BINAMÉ et al., 2010).

Entretanto, a cascata de sinalização de Rac1 está ativada somente na migração mesenquimal, sendo que durante a migração ameboide a cascata ativada é a da proteína RhoA (BINAMÉ et al., 2010), que regula a montagem de fibras de estresse e está associada às adesões focais através das proteínas efectoras mDia e das quinases ROCKI e ROCKII. A atividade destas proteínas faz com que haja interação das moléculas de miosina com o citoesqueleto de actina, gerando a contração celular (VIAL et al., 2003), principal evento que impulsiona o citoplasma durante a migração ameboide (BINAMÉ et al., 2010).

1.3 Jaspamídeo

Os cânceres são doenças complexas que necessitam de diferentes terapias que atuem em diversos alvos (TERRACCIANO et al., 2008). Como os microtúbulos estão altamente envolvidos na proliferação celular, que quando descontrolada é uma das principais características patológicas do câncer, essas proteínas do citoesqueleto tornaram-se alvo preferencial para a terapia do câncer (ROVINI et al., 2011).

Sabe-se que a principal causa de morte nos pacientes de câncer são os tumores secundários causados por metástases (SIMPSON et al., 2008), e neste contexto, compostos que atuam nas diferentes etapas do processo de migração são a princípio candidatos a agentes terapêuticos na prevenção deste fenômeno (TERRACCIANO et al., 2008). Dentre estes a molécula jaspamídeo (também conhecido como *jasplakinolide*) é um membro representativo da família dos depsipeptídeos cíclicos (marcador químico do gênero *Japis* de poríferos) que interferem seletivamente nos microfilamentos de actina produzindo um efeito anti-

polimerizante (TERRACCIANO et al., 2008) como aquele observado pela faloidina sobre a F-actina (TERRACCIANO et al., 2004). Desde a descoberta do jaspamídeo, em 1986, outros gêneros de poríferos foram testados para a verificação da existência dessa classe de peptídeos, e sua síntese e modificação foi possível desde então (ZAMPELLA et al., 1999). Dados de padrão citotóxico significativo em 60 tipos de células diferentes com seletividade para linhagens celulares renais, prostáticas e de células CNS foram um estímulo inicial para trabalhos posteriores (ROBINSON et al., 2010).

Outros gêneros (*Auletta constricta*, *Hemiaspisterella minor*, *Auletta constricta* e *Auletta* sp.) e ordens distantes do gênero *Jaspis* (Choristida com a espécie *Geodia* sp., Axinellidae com o gênero *Cymbastela* sp., Hadromerida com a espécie *H. minor* e Lithistida com a espécie *Neosiphonia superstes*) também apresentaram síntese de moléculas de jaspamídeo, aumentando a diversidade de fontes dessa droga (ROBINSON et al., 2010; ZAMPELLA et al., 1999), com 14 análogos descritos até 2009 pelo grupo de Zampella (jaspamídeos B-H e J-P) (ROBINSON et al., 2010).

O papel biológico dos jaspamídeos para estas esponjas é desconhecido, mas a hipótese mais aceita é a de que esta molécula tenha uma função relacionada aos simbiontes destes animais (ZAMPELLA et al., 1999). Resultados semelhantes ainda não publicados obtidos por Schmitz em 1998 (ROBINSON et al., 2010) envolveram o estudo não só do gênero *Jaspis*, mas também do gênero *Dorypleres*, nos quais descritos não apenas o jaspamídeo, mas também o jaspamídeo debromo, o jaspamídeo 13-demetil, e os jaspamídeos B, C e E além de outros três análogos modificados do triptofano. Mais recentemente o grupo de Crews (EBADA et al., 2009) publicou a estrutura das moléculas de jaspamídeos Q e R, debromo e jaspamídeo dibromo (ROBINSON et al., 2010).

Os efeitos biológicos do jaspamídeo e de suas moléculas análogas (interação com actina, indução de apoptose, indução de poliploidia, citotoxicidade e interação com tubulina) foram verificados em diferentes modelos celulares, dentre eles cânceres de mama, cólon, bexiga, pulmão, tecido glandular, células do sistema imune e próstata (CIOCA; KITANO, 2002; GALA et al., 2007; TAKEUSHI et al., 1998; TERRACCIANO et al., 2004, 2008). Essa molécula também tem efeitos de anti-helmíntico, inseticida e de toxina para peixes (ROBINSON et al., 2010).

Portanto, esta droga possui potencial no quadro dos fármacos utilizados nas terapias para a cura do câncer já que a migração celular e o citoesqueleto de actina

possuem um papel relevante sobre o processo de metástase (FREITAS et al., 2008; POLLARD; BORISY, 2003).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é avaliar os efeitos de jaspamídeo sobre o citoesqueleto de actina de células em cultura derivadas de melanoma e melanocíticas normais e suas consequências sobre a capacidade de migração. Neste contexto dois aspectos paralelos são importantes: se há morte celular e se o efeito da droga é reversível ou estável. Assim são os objetivos específicos:

- 1- Determinar o IC50 da droga para cada tipo celular;
- 2- Utilizar esta concentração para tratamentos posteriores em que foi avaliada a organização do citoesqueleto por microscopia de fluorescência com faloidina e anticorpos anti-actina e anti-MT1-MMP;
- 3- Avaliar a migração celular nas mesmas condições de tratamento pelos ensaios de ferida na monocamada, migração em placas de *transwell* e invasão em câmara de Boyden;
- 4- As células tratadas foram também submetidas à recuperação em meio sem droga para análise da reversão do efeito da mesma.
- 5- Verificar a associação da expressão da proteína WAVE2 com a resposta ao tratamento com a droga jaspamídeo em linhagens celulares melanocíticas normais e de melanoma humano.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens celulares, condições de cultivo e tratamento

Foram utilizadas uma linhagem celular derivada de melanoma maligno humano (HT144) e uma linhagem de melanócitos humanos provenientes de nevus azul (NGM). Ambas foram mantidas em frascos de 25 cm² a 37 °C, em atmosfera contendo 5% CO₂, com meio de cultura DMEM/Ham's F-12 (*Dulbecco's Modified Eagles's Minimum Essential Medium*, Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil). Alíquotas da cultura foram congeladas e mantidas em recipientes contendo nitrogênio líquido, crio-protegidas com 5-10% de dimetil sulfoxido (DMSO-Sigma).

As linhagens utilizadas foram submetidas à 48 h de tratamento, sendo que havia três grupos de tratamento além do controle: IC50 (tratadas com 100 nM para a linhagem HT144 e 150 nM para a linhagem NGM), IC50/2 (tratadas com 50 nM para a linhagem HT144 e 75 nM para a linhagem NGM) e IC50 + 48 h (tratadas com 100 nM para a linhagem HT144 e 150 nM para a linhagem NGM seguidos de 48 h de recuperação com meio de cultura suplementado com 10% de soro bovino fetal sem droga).

3.2 Jaspamídeo

O jaspamídeo é originalmente identificado em extratos de *Japis splendens*, e foi adquirido da Molecular Probes/Invitrogen (EUA). A droga foi dissolvida em DMSO e diluída em PBSA até a concentração de 100 µM (solução-estoque). Os tratamentos foram realizados na fase exponencial de crescimento da cultura.

3.3 Citometria de fluxo

Células tratadas ou não com diferentes concentrações de jaspamídeo foram contadas a fim de definir a melhor concentração a ser utilizada durante o trabalho. Para tanto, as células na densidade de 3×10^3 foram desprendidas da placa de 96 poços com tripsina e ressuspensas em meio DMEM. A seguir as amostras foram analisadas no aparelho de citometria de fluxo (GUAVA TECHNOLOGIES, EUA) para

que fosse determinado o número de células existentes nos poços após o tratamento. Os experimentos foram realizados em triplicata dos grupos controle (livre da droga) e grupos tratados com as concentrações de 50, 200, 400, 600 e 800 nM de jaspamídeo. Cada grupo teve 5000 células contadas para a determinação de sua concentração por mL.

3.4 Ensaio de ferida (*Wound assay*)

As linhagens celulares de melanoma maligno e de melanócitos cresceram em placas de 35 mm² até atingirem a confluência. Em seguida, foi feita uma “ferida” na monocamada, através de delicada passagem de ponteira de pipeta de 10 µL sobre a mesma. Essa passagem determinou uma descontinuidade na monocamada, cujas células em sua margem tenderam a migrar para os espaços vazios.

Depois de realizadas as “feridas”, as células cresceram em meio acrescido de jaspamídeo na concentração do IC50 e do IC50/2. Células tratadas em meio DMEM sem a droga serviram como controle. Pontos de referência foram demarcados no fundo de cada placa, a fim de permitir obtenção de fotomicrografias das mesmas regiões das “feridas” em diferentes tempos (0, 24 e 48 horas). A migração celular foi avaliada como área livre (arbitrariamente marcada como região com ausência de células) e esta foi medida com o auxílio do programa Image J (software de domínio público desenvolvido por Wayne Rasband, NIMH, NIH, USA), sendo que o decréscimo percentual da área da “ferida” caracterizou o índice de migração celular. Os ensaios foram obtidos em triplicatas de cada grupo testado.

3.5 Citoquímica fluorescente

As células na densidade de 5×10^5 células/mL foram crescidas em placas de 35 mm² contendo lamínulas de vidro de 18x18 mm. Após os tratamentos estas foram fixadas em acetona a -20 °C por 15 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens em PBSA e permeabilização com solução a 0,5% de Triton X-100 (Sigma) em PBSA por 15 minutos. Após a permeabilização ocorreu o tratamento com RNase (10 mg/mL) por 30 minutos. Após novas lavagens com PBSA os microfilamentos foram marcados com faloidina conjugada à FITC por uma hora. A seguir as lamínulas foram lavadas com PBSA e o núcleo foi contra-corado com iodeto de

propídeo (Molecular Probes, P1304MP). Os resultados foram analisados por microscopia confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510, EUA).

3.6 Ensaios de Migração em Placas de *Transwell*

A análise do efeito do jaspamídeo nas duas linhagens foi realizado através de dois procedimentos: ensaios de “ferida” em monocamada em placas de 35 mm; e de câmaras *transwell* (membrana porosa de 8 µm) de 24 poços com câmaras superior e inferior (Corning Life Science, EUA).

Para o ensaio com câmaras *transwell*, os procedimentos foram conduzidos de acordo com o protocolo descrito por Glynn et al., 2008. As células foram tratadas com tripsina, para que se desprendessem de seus frascos, e colocadas na densidade de 1×10^6 células/mL de meio de cultura na porção superior da câmara. Após as células aderirem, meio de cultura sem soro bovino fetal foi colocado na parte superior com o jaspamídeo. Como controles, foram utilizados meio de cultura sem soro e sem adição da droga. Na câmara inferior induzimos a migração com meio de cultura suplementado com 10% de soro. Para o grupo que passou por recuperação o meio com droga foi incubado por 48 h e retirado para que meio de cultura sem jaspamídeo e sem soro fosse colocado.

As células que migraram, atravessaram a membrana e ficaram na parte inferior da mesma. A parte superior foi raspada delicadamente, a fim de retirar as células que não migraram. As células da parte inferior foram fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos e coradas com 0,2% de cristal violeta em 20% de metanol *overnight*. Imagens das células que migraram obtidas no microscópio EVOS (EVOS xl, AMG,EUA) permitiram a contagem do número de células nos grupos estudados através do software do próprio aparelho.

3.7 Ensaios de Invasão em Câmara de Boyden

Complementando o estudo de ensaio de migração, avaliamos em seguida se a ação do jaspamídeo possui a capacidade de inibir ou estimular a invasão celular. Foi utilizado um sistema de placas de *transwell* ou câmara de Boyden em placa de 24 poços formando assim um sistema com câmara superior e câmara inferior. A câmara superior contém membrana de policarbonato de 8 µm de diâmetro que foi

coberta por Matrigel (Sigma-Aldrich) na concentração de 1 mg/mL. As células foram tratadas com tripsina, para que se desprendessem de seus frascos, e colocadas na densidade de 1×10^6 células/mL de meio de cultura sem soro com jaspamídeo na porção superior da câmara. Meio de cultura com soro foi colocado na parte inferior. Dessa maneira, na porção superior havia Matrigel e células em meio de cultura sem soro com ou sem jaspamídeo e na porção inferior meio com soro.

As culturas foram incubadas por 48 horas. Para o grupo que passou por recuperação o meio com droga foi incubado por 48 h e retirado. Para que o Matrigel fosse retirado da câmara superior as células foram lavadas com meio DMEM sem soro gelado (8 °C) e em seguida o meio de cultura sem jaspamídeo e sem soro foi colocado.

As células que atravessaram a barreira do Matrigel e a membrana porosa foram analisadas de acordo com o mesmo protocolo descrito para o ensaio de migração.

3.8 Western blotting

As células foram lisadas em tampão RIPA contendo inibidores de protease (1 mg/ml pepstatina A, 100 mM PMSF e 1mg/ml E-64). Os lisados foram sonicados e, em seguida, centrifugados a 10.000 g por 10 minutos a 4 °C. As proteínas foram quantificadas através do método de BCA (Pierce Inc Rockford, EUA) e em seguida foram ressuspendidas em tampão de amostra contendo 3% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 150 mM Tris pH 6.8, 15% de mercaptoetanol, 30% de glicerol e 0,01% de azul de bromofenol. Foi realizada eletroforese seguindo o método SDS-PAGE sendo que o gel foi carregado com 30µg de proteína por poço, sendo estas separadas em gel de poliacrilamida 10% (preparado com 1,5 M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham, EUA) e em seguida foram bloqueadas com 5% de leite em TBS-tween (TTBS). Após o bloqueio estas foram incubadas com anticorpos primários que foram detectados por anticorpos secundários conjugados com peroxidase. O protocolo de quimioluminescência (ECL kit, Amersham) foi utilizado para revelar a reação em filmes radiográficos.

3.9 Imunofluorescência

Neste ensaio as células na densidade de 5×10^5 células/mL também foram crescidas em placas de 35 mm^2 contendo lamínulas de vidro de $18 \times 18 \text{ mm}$. Após os tratamentos as células foram fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos. Em seguida foi realizada lavagem em PBSA e permeabilização com solução a 0,5% de Triton X-100 (Sigma) em PBSA por 15 minutos. Seguido da permeabilização ocorreu o tratamento com RNase (10mg/mL) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBSA a proteína MT1-MMP e os microfilamentos foram marcados com anticorpo primário específico (R&D Systems MAB 918 anti-mouse e abcam ab49846 anti-mouse, respectivamente) *overnight*. A seguir as lamínulas foram lavadas com PBSA e ocorreu incubação de 3 horas com o anticorpo secundário específico (anti-mouse FITC Sigma F9137). Por fim o núcleo foi contra-corado com iodeto de propídeo (Molecular Probes, P1304MP). Os resultados foram analisados por microscopia confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510).

3.10 Ensaio de viabilidade (*ViaCount*)

Com o objetivo de analisar a viabilidade celular das linhagens utilizadas neste trabalho, tanto os grupos controle quanto os tratados foram crescidos na densidade de 5×10^5 células/mL em placas de 35 mm^2 . As células foram então tratadas com solução de tripsina para a sua suspensão. Em seguida elas são contadas no citometro de fluxo para serem diluídas 10X no reagente *ViaCount*. As amostras são então encubadas por no mínimo 5 minutos e resultados são analisados no aparelho de citometria de fluxo (GUAVA TECHNOLOGIES). Cada amostra teve 5000 células analisadas.

3.11 Ensaio de detecção de morte apoptótica (Anexina-V FITC x Iodeto de Propídeo)

Para analisar a quantidade de células que morreram por apoptose após o tratamento com a droga as células foram submetidas à análise pelo kit ApoTarget

(Invitrogen, PHN1018). As células foram colocadas em placas de 35 mm² na densidade de 2x10⁶ células/mL e foram submetidas aos tratamentos citados no item 3.1 além do grupo adicional controle positivo, que passou por 1 minuto de irradiação com luz UV sem meio de cultura. Após a irradiação este grupo passou por recuperação de 24 horas antes da preparação para a análise através do kit. Para tanto as células foram desprendidas da placa com tripsina e ressuspensas em meio DMEM. Estas foram então lavadas duas vezes com PBSA e depois diluídas no tampão de ligação de Anexina-V previamente diluído 10X. Após aliquotar as células no volume de 100 µL por tubo foram adicionados 5 µL de solução de Anexina-V e 10 µL de solução de iodeto de propídeo. Estes foram incubados por 15 minutos no escuro e depois foram adicionados mais 400 µL de tampão de ligação de Anexina-V para a análise por citometria de fluxo (GUAVA TECHNOLOGIES). Cada amostra teve 5000 células analisadas.

3.12 Inibidores de Rac e ROCK

Com o objetivo de verificar qual o tipo de migração que constitui a movimentação das linhagens supracitadas foram feitos ensaios de migração em placas de *transwell* e invasão em câmara de Boyden com os inibidores da proteína Rac (553502 Rac1 Inhibitor, NSC23766, Calbiochem) e da proteína ROCK, efetora da via Rho (ROCK Inhibitor, (R)-(+)-trans-N-(4-Pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxamide 2HCl, 688000 Y-27632, Calbiochem). Os inibidores foram diluídos em água nas concentrações de 0,1 M e 5 mM, sendo utilizadas nos experimentos as concentrações de 200 µM e 30 µM, respectivamente. As concentrações utilizadas neste trabalho foram determinadas por comunicação pessoal com a Prof. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos.

Para os ensaios de migração e invasão foram testados cinco grupos para cada linhagem: um grupo controle encubado por 48 h com meio DMEM sem soro bovino fetal, um grupo tratado com inibidor encubado por 48 h, um grupo tratado com inibidor acrescido do IC50 da droga encubado por 48 h, um grupo tratado com inibidor acrescido de IC50/2 encubado por 48h e um grupo tratado com inibidor acrescido do IC50 da droga seguido por 48h de recuperação em meio de cultura sem soro bovino fetal.

4 RESULTADOS

As curvas de crescimento das linhagens celulares NGM e HT144 foram necessárias para determinar o inóculo inicial de células para cada experimento e escolha do melhor momento para os tratamentos com o jaspamídeo.

Comparando-se as curvas das duas linhagens celulares utilizadas (Figura 1) podemos verificar que a linhagem NGM apresentou crescimento mais lento em comparação com a linhagem HT144 de melanoma. Sendo assim, os tempos em cultura foram determinados respeitando-se o limite máximo de crescimento de cada população celular.

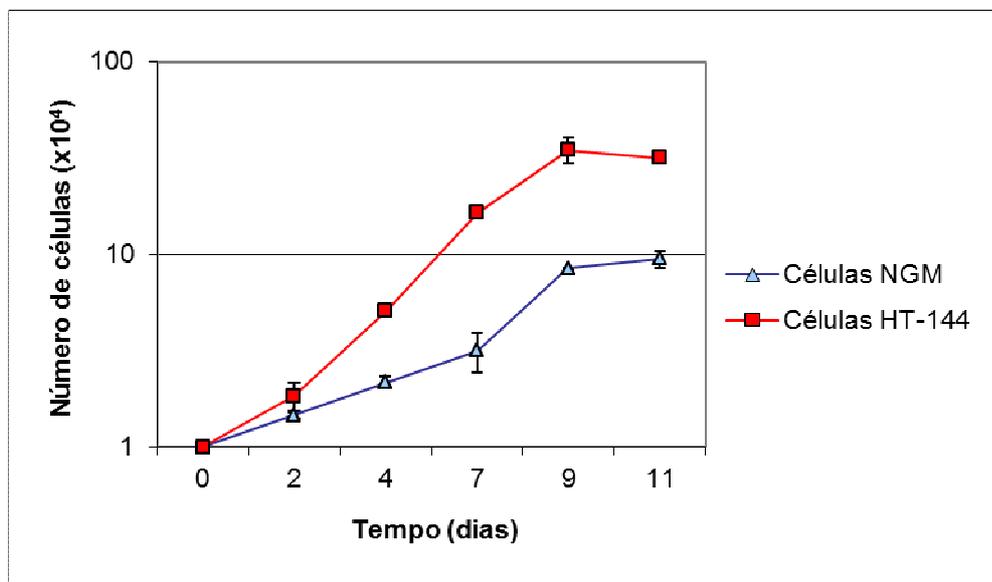


Figura 1 – Curvas de crescimento das linhagens NGM e HT144.

Tendo em posse as informações necessárias para a determinação do inóculo inicial através da curva de crescimento, a deliberação do IC50 foi realizada por meio de citometria de fluxo. Ambas as linhagens foram semeadas em placas de 96 poços na concentração inicial de 5×10^3 células/poço. Foram feitas contagens das células viáveis após tratamento por 48 h com várias concentrações da droga. Segundo a análise das linhas de tendência exponenciais foram encontrados os valores das concentrações de IC50: 100 nM para a linhagem HT144 e 150 nM para a linhagem NGM (Figura 2).

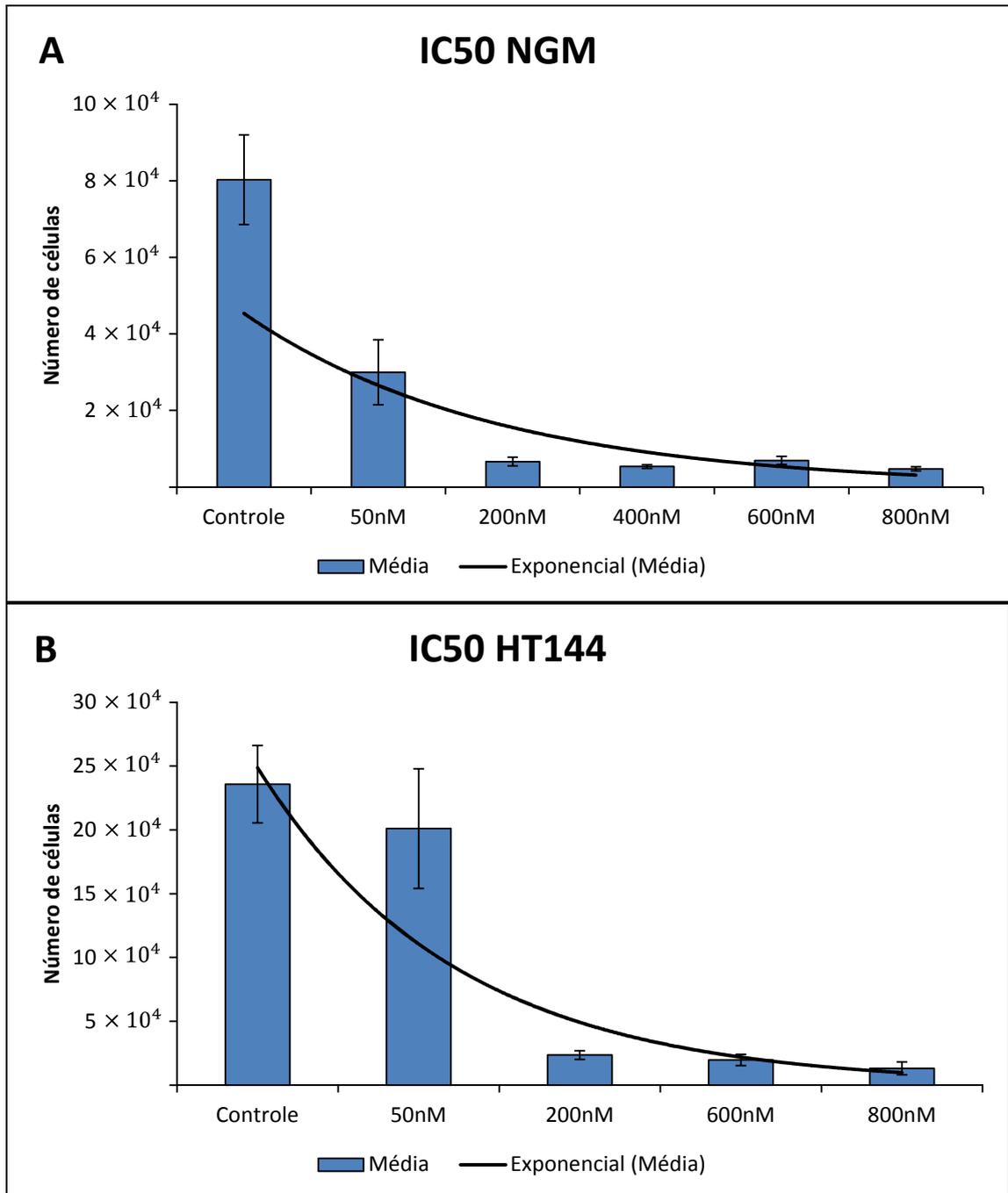


Figura 2 - Curva exponencial mediana mostrando o efeito de diferentes concentrações de jaspamídeo após 48 horas de tratamento com a droga. A: curva da linhagem de melanócitos derivados de nevus azul. B: curva da linhagem derivada de melanoma.

Conhecendo-se a concentração do IC50 de cada linhagem, foram realizados ensaios para análise da viabilidade celular, bem como para determinação do índice apoptótico (Figura 3) das células após o tratamento com jaspamídeo por 48 horas (Tabela 1).

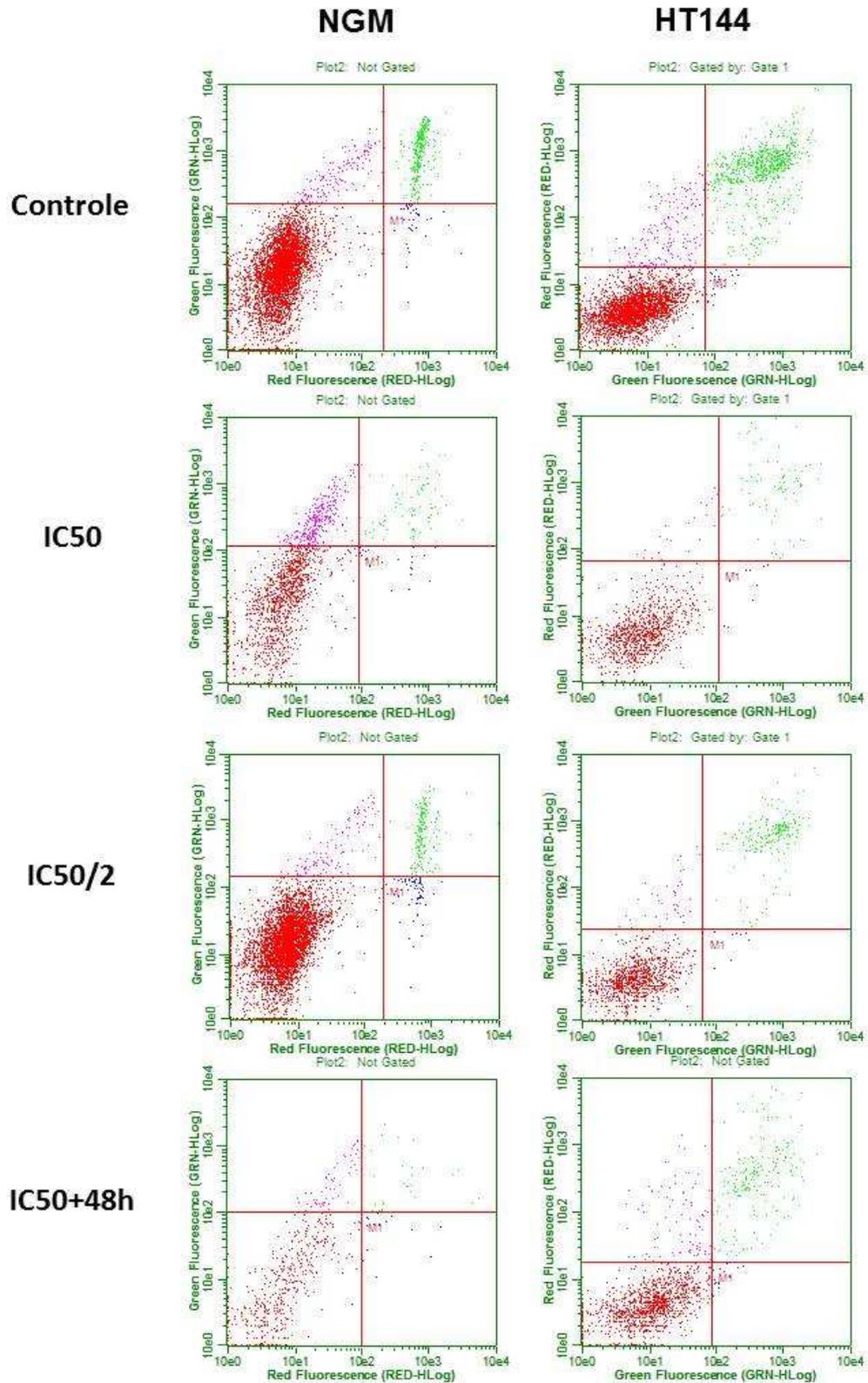


Figura 3 – Ensaio de índice apoptótico das linhagens NGM (gráficos à esquerda) e HT144 (gráficos à direita) mostrando células vivas no quadrante inferior esquerdo, células mortas por apoptose inicial no quadrante inferior direito, células mortas por necrose no quadrante superior esquerdo e células mortas por apoptose tardia no quadrante superior direito.

Após a análise das amostras por meio do teste t de *Student* ($\alpha=5\%$) observou-se que as células da linhagem NGM têm um aumento estatisticamente significativo na porcentagem de células consideradas necróticas após tratamento com a concentração do IC50 da droga em relação ao controle. Também houve aumento na concentração de células em apoptose tardia no grupo tratado com 150 nM sem período de recuperação em relação ao controle e aos outros grupos de tratamento com jaspamídeo. Esse grupo também apresentou uma diminuição estatisticamente significativa na população de células vivas. O mesmo foi observado no grupo tratado com 150 nM seguido de 48 h de recuperação. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado com 75 nM de jaspamídeo (Figura 4A).

Na linhagem HT144 observou-se aumento na frequência de células vivas em todos os grupos tratados com a droga quando comparados com o grupo controle. Houve aumento estatisticamente significativo da frequência de células mortas por necrose nos grupos tratados com 100 nM de jaspamídeo seguido de recuperação em relação ao controle. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas porcentagens de morte por apoptose entre os grupos tratados e o grupo controle (Figura 4B).

Tabela 1– Distribuição da frequência de células vivas, mortas por apoptose inicial, mortas por apoptose tardia e mortas por necrose nas linhagens NGM e HT144 após tratamento com jaspamídeo.

Célula	Controle	IC50	IC50/2	IC50+48h	
NGM	Vivas	91,57	70,64	93,17	82,27
	Apoptose inicial	0,65	2,16	0,97	2,99
	Necrose	3,22	18,16	2,42	10,05
	Apoptose tardia	4,56	9,04	3,43	4,71
HT144	Vivas	69,14	85,72	86,96	82,24
	Apoptose inicial	0,86	1,42	0,81	0,95
	Necrose	4,47	1,87	2,01	4,93
	Apoptose tardia	17,91	10,99	10,23	11,86

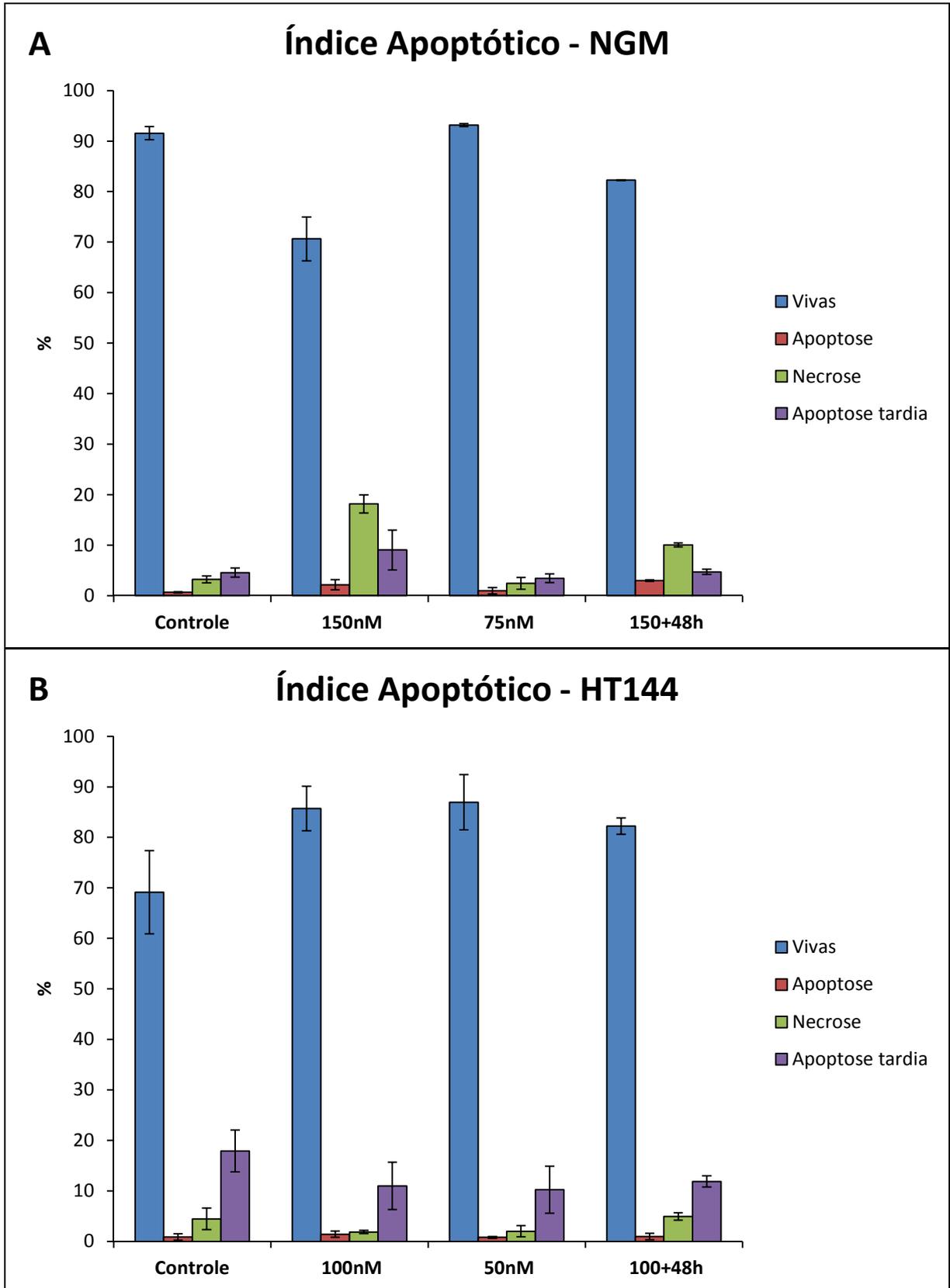


Figura 4 – Hitogramas do ensaio de índice apoptótico das linhagens NGM (gráfico A) e HT144 (gráfico B) mostrando as porcentagens de células vivas (barras azuis), mortas por apoptose inicial (barras vermelhas), mortas por necrose (barras verdes) e mortas por apoptose tardia (barras lilás). Cada amostra teve n=5000.

Como já era conhecido o tipo de morte que levava à diminuição da população de células em cultura após os tratamentos foi realizado o ensaio de viabilidade celular feito utilizando-se o kit ViaCount (Figura 5) onde podemos observar (Tabela 2) que para a linhagem NGM não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle quanto à frequência de células viáveis e inviáveis, exceto no grupo tratado com 75 nM de jaspamídeo, que apresenta aumento na frequência de células viáveis (Figura 6A). Já para a linhagem HT144 não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratados tanto para a porcentagem de células viáveis quanto para a porcentagem de células inviáveis (Figura 6B).

Uma vez que não foram detectadas alterações significativas na viabilidade celular das linhagens estudadas após o tratamento com jaspamídeo por 48 horas, a morfologia das células foi analisada utilizando-se corante para o citoesqueleto de actina. Foram encontradas mudanças importantes no padrão dos filamentos de actina de células tratadas com a droga, o que se refletiu em células morfologicamente diferentes.

Tabela 2 - Distribuição da frequência de células viáveis e inviáveis nas linhagens NGM e HT144 após tratamento com jaspamídeo

Célula		Controle	IC50	IC50/2	IC50+48h
NGM	Viáveis	88,795	95,07	97,23	86,85
	Inviáveis	4,98	4,50	2,63	3,93
HT144	Viáveis	97,61	97,33	96,82	88,34
	Inviáveis	1,23	1,73	2,06	6,09

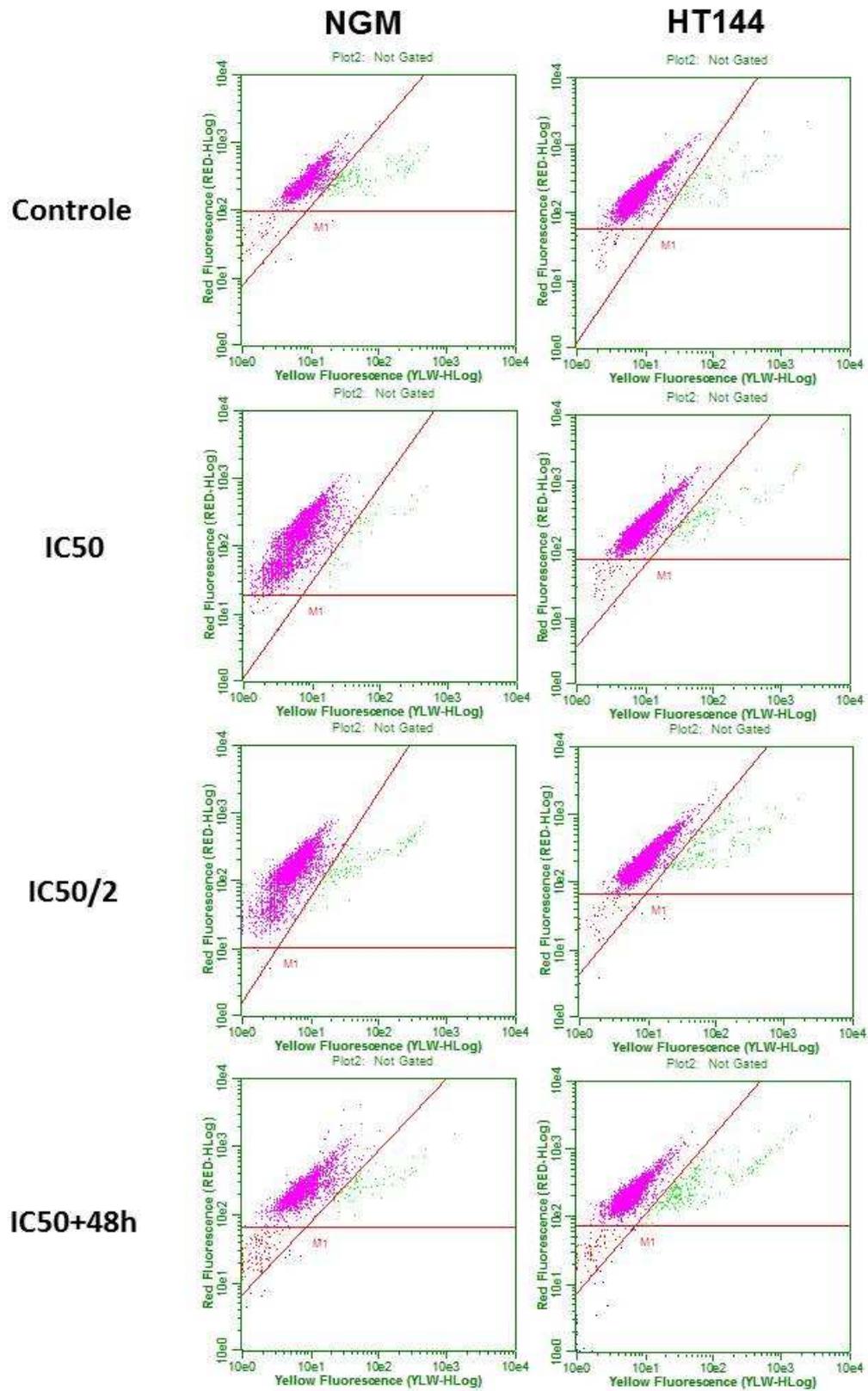


Figura 5 – Ensaio de viabilidade celular com kit ViaCount das linhagens NGM (gráficos à esquerda) e HT144 (gráficos à direita) mostrando células viáveis no quadrante superior direito e células inviáveis no quadrante superior esquerdo. Cada amostra teve n=5000.

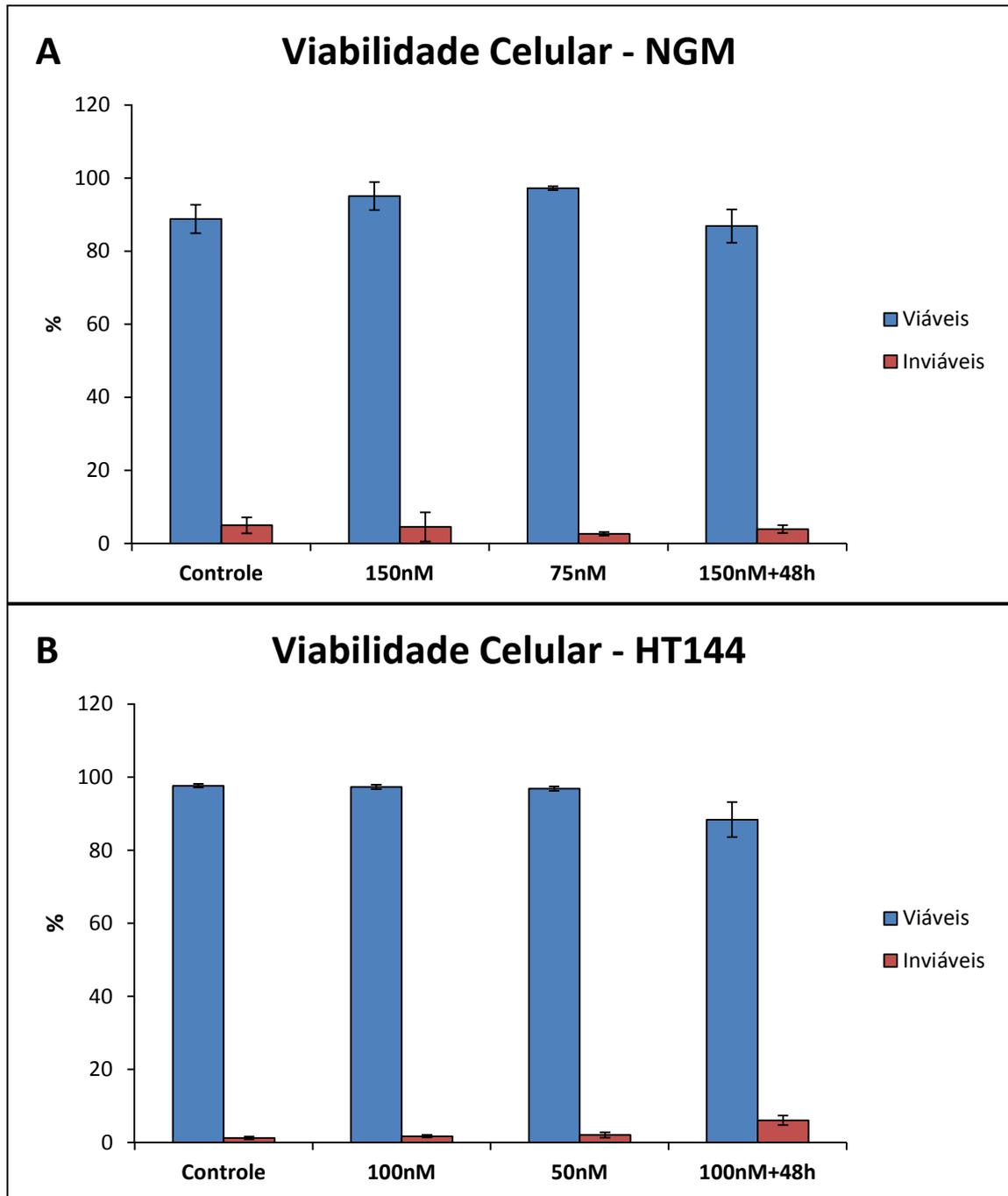


Figura 6 – Histogramas do ensaio de viabilidade celular com kit ViaCount das linhagens NGM (gráfico A) e HT144 (gráfico B) mostrando as porcentagens de células viáveis (barras azuis) e inviables (barras vermelhas). Cada amostra teve n=5000.

As células estudadas apresentam microfilamentos nitidamente organizados em fibras tensionadas (*stress fibers*) (Figuras 7 A e B). No grupo submetido ao tratamento por 48 h (IC50) (Figuras 7 C e D) o arranjo de fibras tensionadas alterou-

se em ambas as linhagens, sendo possível observar pequenos fragmentos de F-actina formando aglomerados localizados próximo ao núcleo. Tal característica manteve-se mesmo após o tempo de recuperação, sendo que, gradativamente, houve uma tendência das células a reassumirem morfologia semelhante à apresentada pelo grupo controle. Após a exposição das linhagens a metade da concentração do IC50, as células NGM não apresentaram mudanças significativas em suas fibras tensionadas (Figuras 7 G e H). Todavia, na linhagem HT144, os microfilamentos mostraram-se desorganizados. Não foi observada a formação de aglomerados, mas, os filamentos de actina mostraram-se dispersos na região perinuclear.

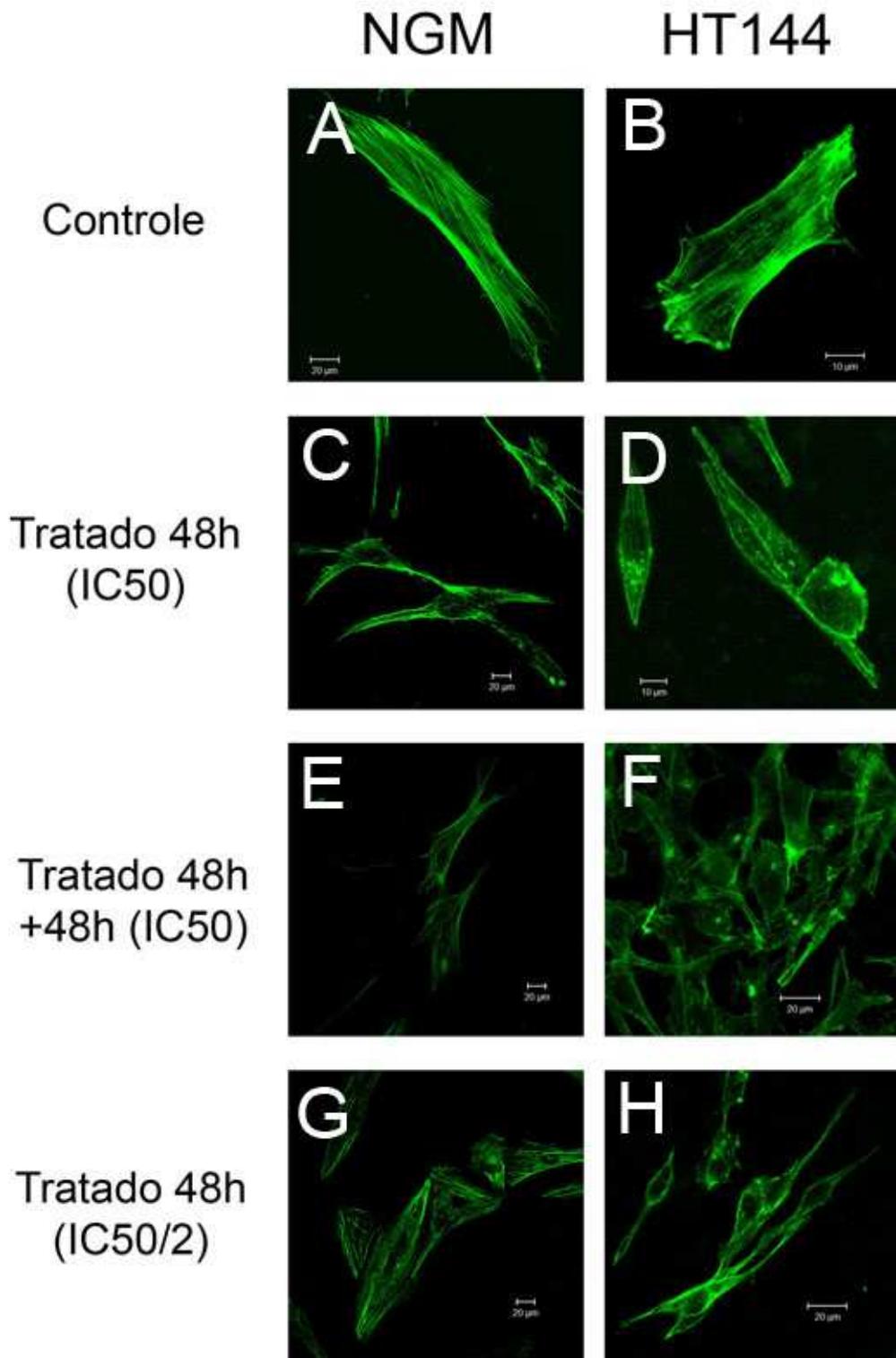


Figura 7 – Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser mostrando microfilamentos marcados com faloidina-FITC (verde). A figura E representa a projeção das secções ópticas em um único plano obtidas pelo microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510).

A linhagem NGM, quando submetida ao tratamento com a concentração correspondente ao seu respectivo IC50, não apresentou diferenças significativas na sua morfologia quando comparada ao grupo controle após observação à microscopia de luz (Figuras 8 e 9). Já, nas células HT144, foram vistas variações morfológicas entre os grupos controle e tratado (Figuras 10 e 11). Após o tratamento, diferentemente da linhagem NGM (Figuras 8 B, D e F e Figuras 9 B, D e F), as células de melanoma alteraram sua morfologia alongada mostrando um aspecto contraído assumindo uma morfologia mais próxima da esférica (Figuras 10 B, D e F e Figuras 11 B, D e F).

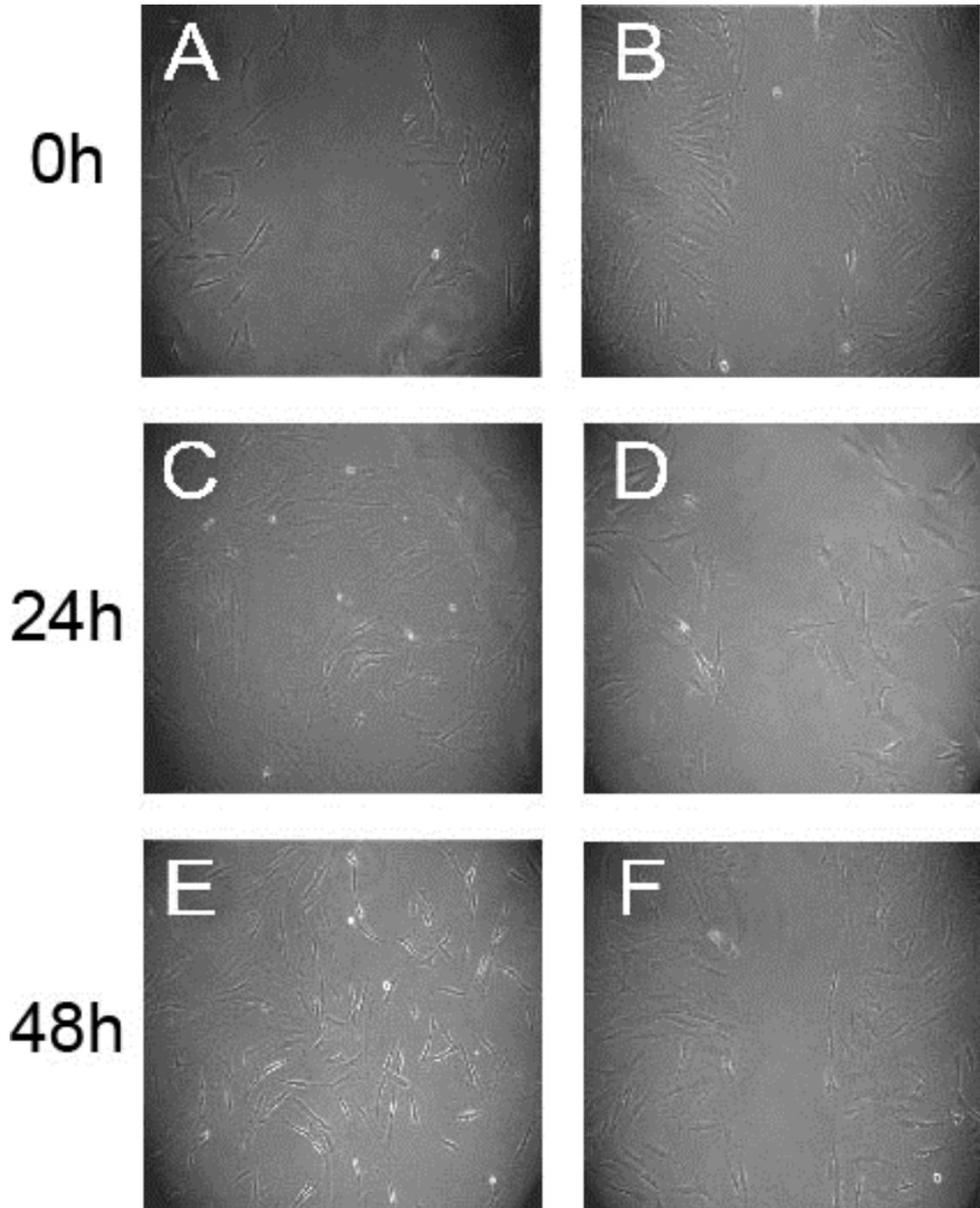


Figura 8 – Fotomicrografias de células NGM durante ensaio de ferida. As imagens A, C e E mostram células dos grupos controles em diferentes tempos. As células tratadas com jaspamídio na concentração de 100mnM são mostradas em B, D e F. Imagens obtidas ao microscópio invertido com objetiva de 20x.

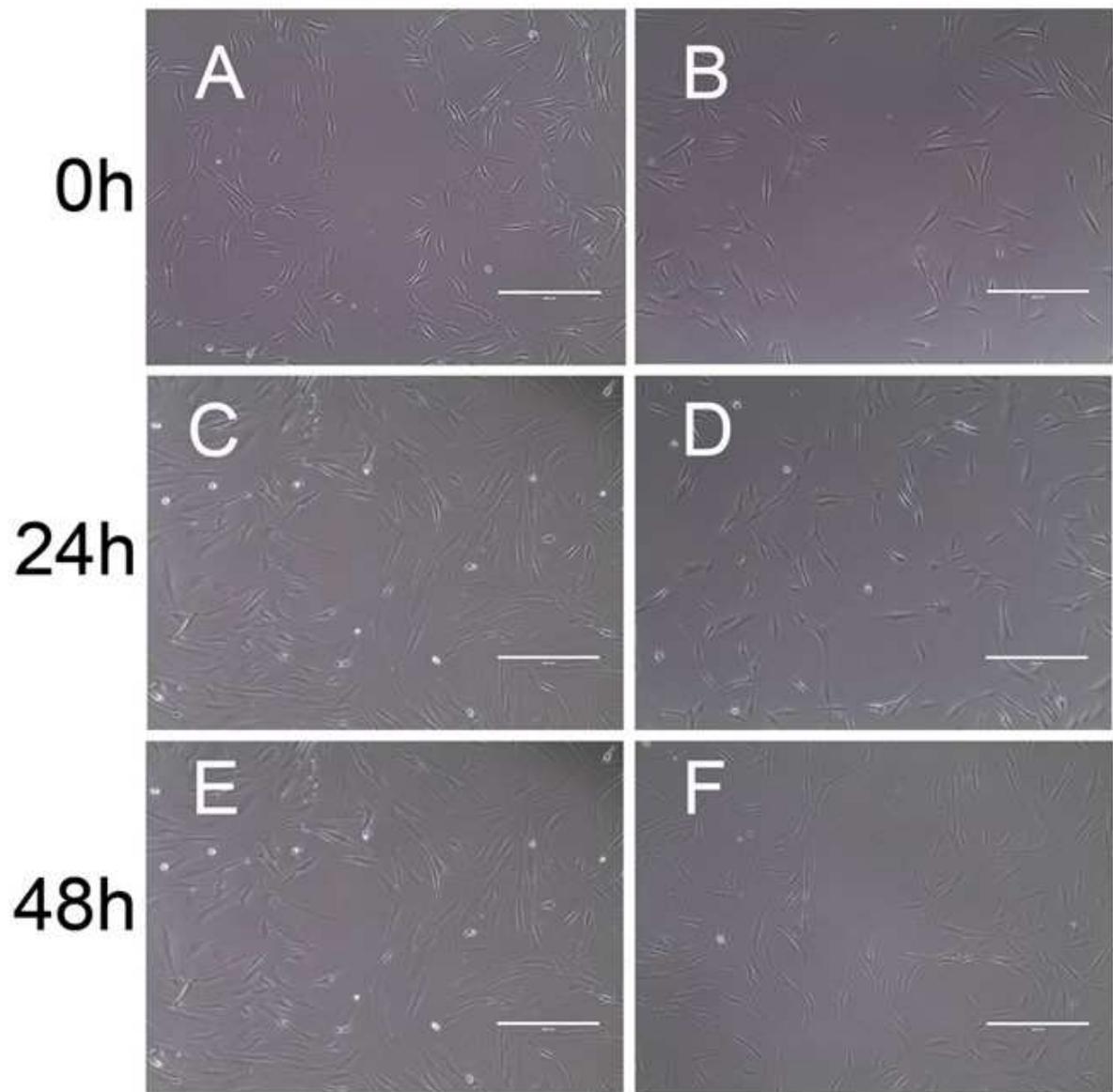


Figura 9 – Fotomicrografias de células NGM durante ensaio de ferida. As imagens A, C e E mostram células dos grupos controles em diferentes tempos. As células tratadas com jaspamídio na concentração de 75 nM são mostradas em B, D e F. Imagens obtidas ao microscópio invertido com objetiva de 20x.

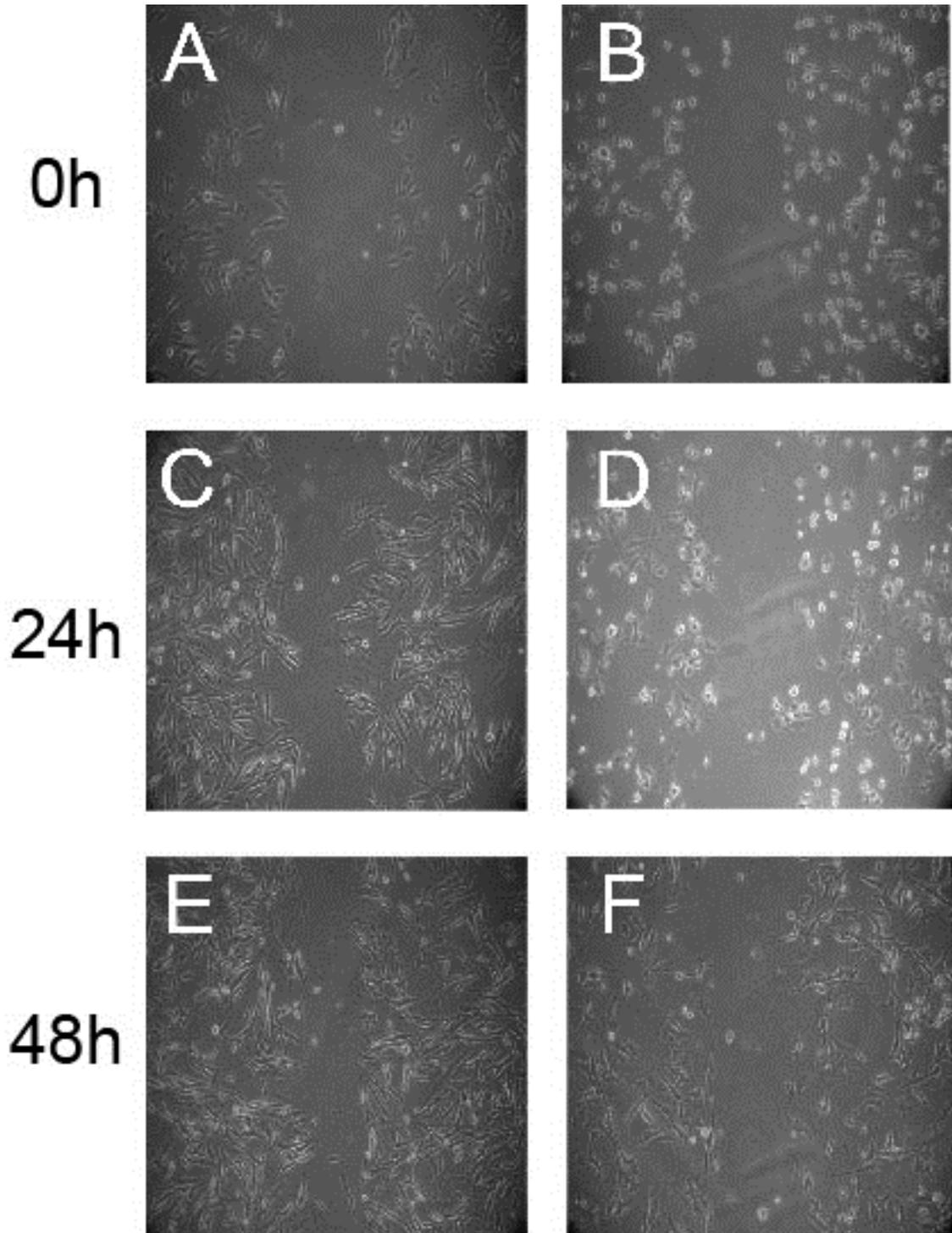


Figura 10 – Fotomicrografias de células HT144 durante ensaio de ferida. As imagens A, C e E mostram células dos grupos controles em diferentes tempos. As células tratadas com jaspamídio na concentração de 100nM são mostradas em B, D e F. Imagens obtidas ao microscópio invertido com objetiva de 20x.

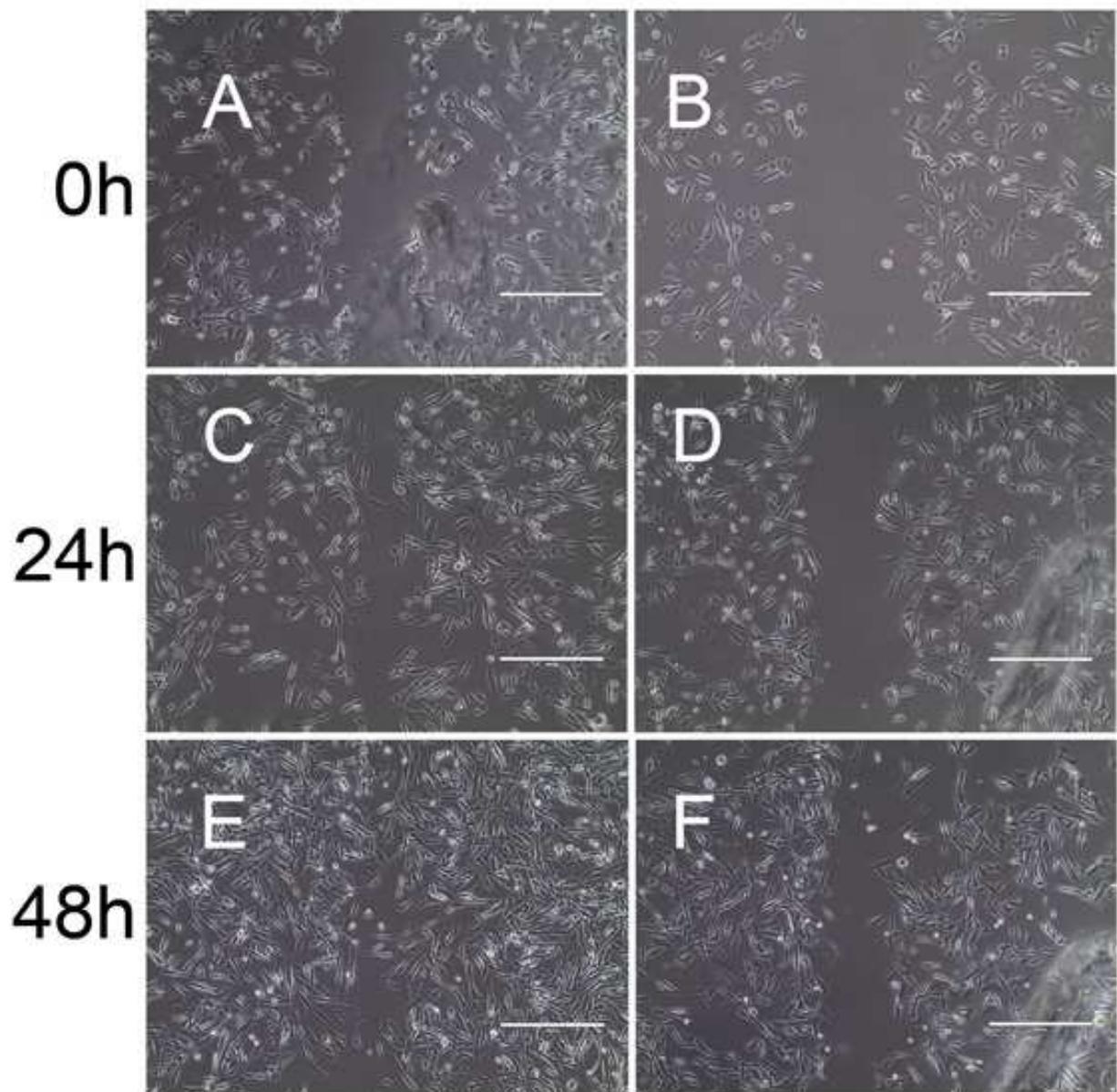


Figura 11 – Fotomicrografias de células HT144 durante ensaio de ferida. As imagens A, C e E mostram células dos grupos controles em diferentes tempos. As células tratadas com jaspamídio na concentração de 50 nM são mostradas em B, D e F. Imagens obtidas ao microscópio invertido com objetiva de 20x.

Nos ensaios de ferida (Figura 12) também foi observada uma diminuição da migração tanto nas células da linhagem NGM tratadas com 150 e 75 nM (Figuras 8 e 9, respectivamente) quanto nas células da linhagem HT144, tratadas com 100 e 75

nM (Figuras 10 e 11, respectivamente). Essa diminuição, também devido à proliferação da população de células, refletiu-se na maior área livre das feridas nos grupos tratados após 24 e 48 horas (Figura 12). Também é importante notar que as áreas livres resultantes da migração das células tratadas com metade do IC50 é maior do as áreas livres das células tratadas com o valor do IC50 para ambas as linhagens (Figura 12).

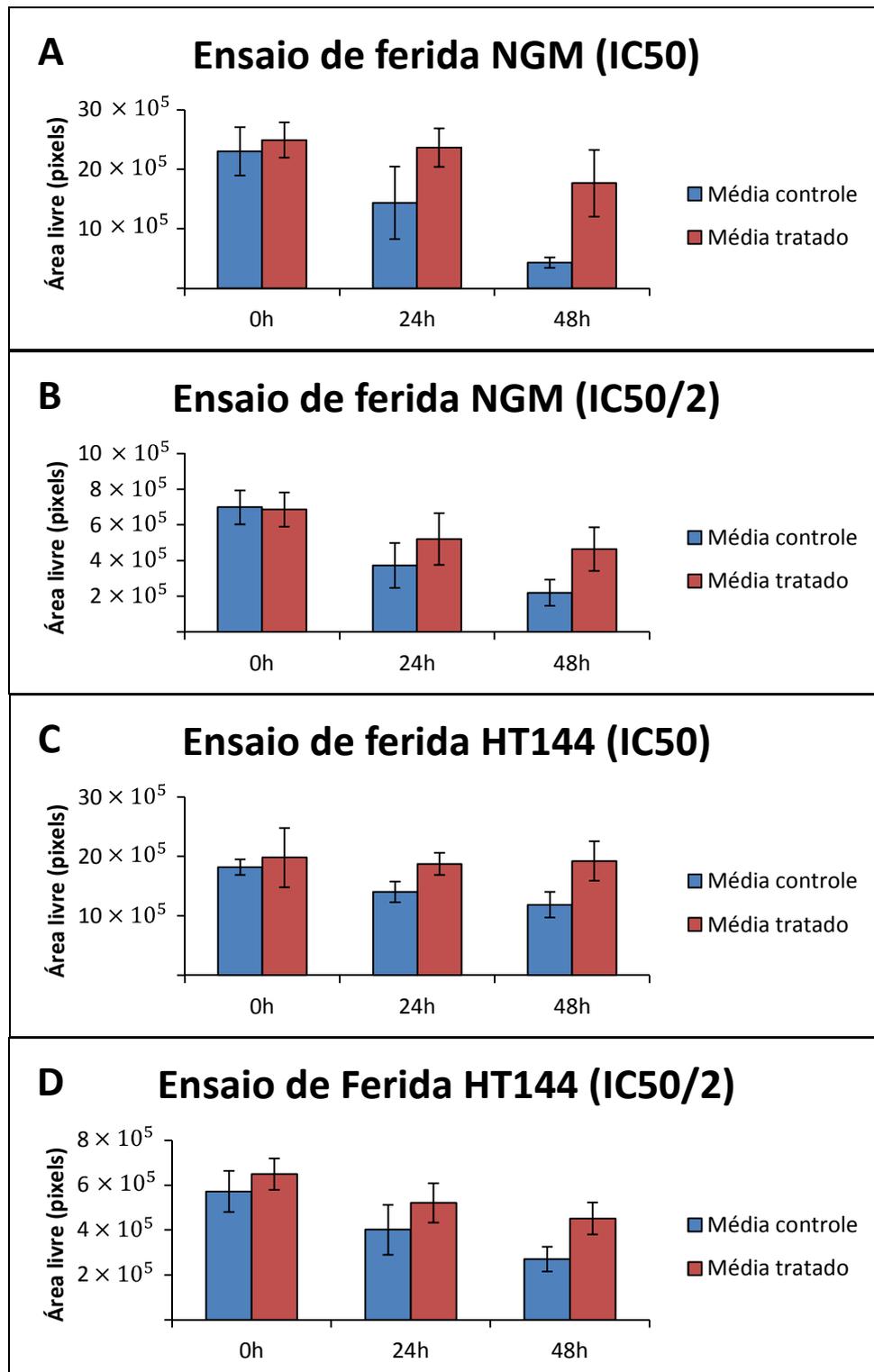


Figura 12 – Histogramas mostrando a área livre (em pixels) das feridas realizadas nas monocamadas das linhagens NGM (gráfico A correspondendo ao tratamento com 150 nM e gráfico B correspondendo ao tratamento com 75 nM) e HT144 (gráfico A correspondendo ao tratamento com 100 nM e gráfico B correspondendo ao tratamento com 50 nM) após incubação por 48 h com jaspamídeo.

Para a melhor avaliação do processo de migração foram realizados ensaios de migração em placas de *transwell*, que mostraram que, para a linhagem NGM, o grupo tratado com metade da concentração do IC50 tem a taxa de migração igual à taxa de migração do grupo controle. Já os grupos tratados com a concentração do IC50 tiveram sua taxa de migração aumentada, sendo o aumento maior para o grupo sem recuperação (Figura 13 A).

A linhagem HT144 o grupo tratado com metade da concentração do IC50 mostrou um incremento em sua taxa de migração, enquanto que os outros grupos de tratamento mostraram uma diminuição menos evidente deste parâmetro quando comparado com a do controle (significância menor que 5%). As células dessa linhagem tratadas com a concentração de 100 nM migraram menos que o grupo tratado com a mesma concentração de droga após seguido de 48 h de recuperação (Figura 13 B).

Nos ensaios de invasão em câmara de Boyden ocorreu diminuição estatisticamente significativa do fenômeno para o grupo tratado com 150 nM na linhagem NGM (Figura 13 C) e aumento estatisticamente significativo do grupo tratado com 100 nM seguido de recuperação na linhagem HT144 (Figura 13 D).

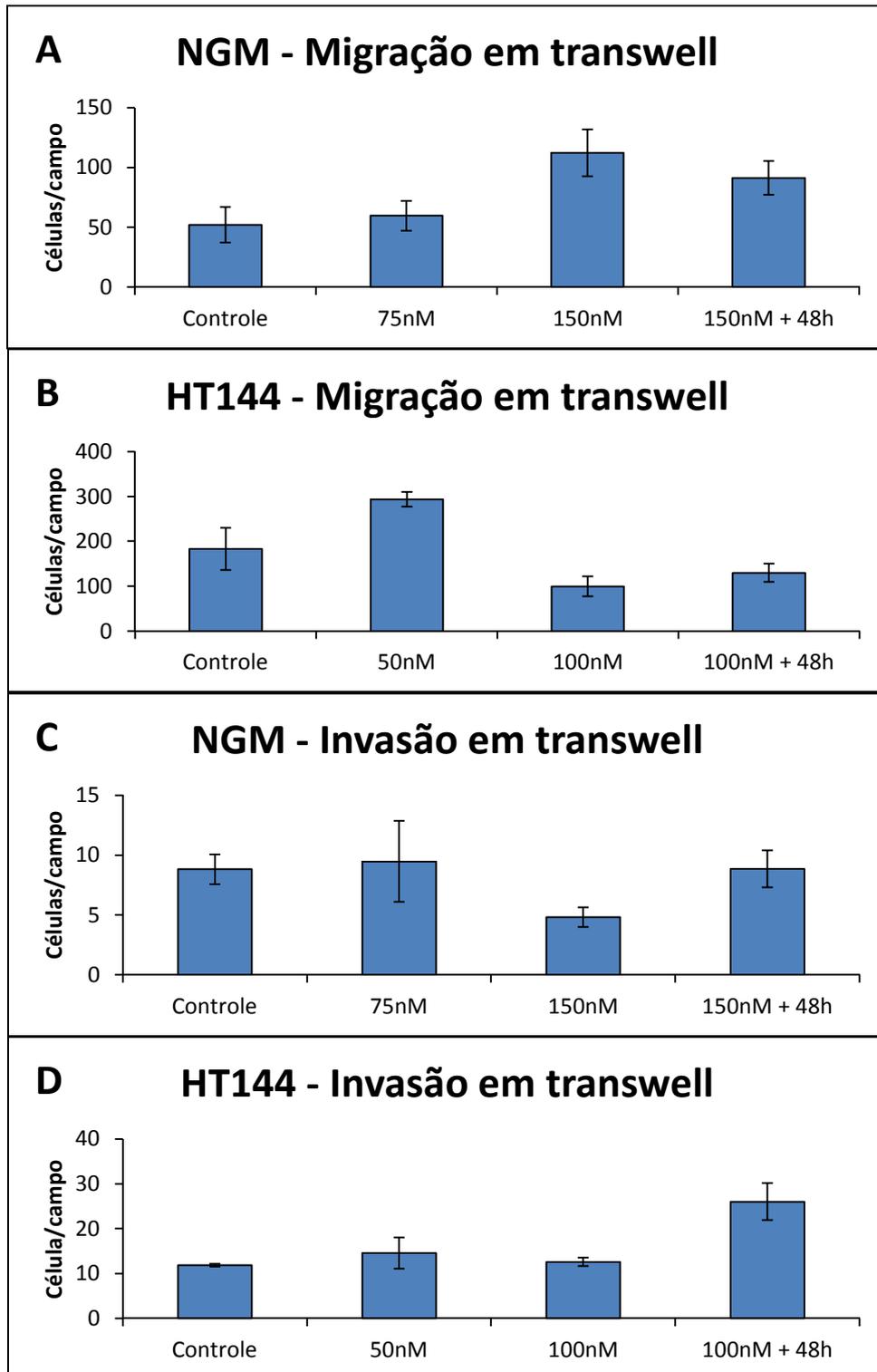


Figura 13 – Histograma representativo da média do número de células das linhagens NGM (gráfico A sendo de migração e C de invasão) e HT144 (gráfico B sendo de migração e D de invasão) contadas por campo da câmara inferior do ensaio de placas de *transwell* de migração e invasão.

Sendo assim, é possível notar que as células estudadas mostraram variações no comportamento migratório em relação a diferentes tratamentos com a droga, e

mostrou-se pertinente caracterizar a localização da enzima MT1-MMP. Durante os ensaios de imunofluorescência observou-se para a linhagem NGM marcação acentuada da proteína MT1-MMP dispersa no citoplasma nos grupos tratados com 150 nM de jaspamídeo, formando acúmulos em diferentes regiões (Figura 14 C) e no grupo tratado com a mesma concentração de droga seguido de 48 h de recuperação (Figura 14 E). Para os grupos controle e tratado com 75 nM da droga não ocorreu acúmulo de marcação na periferia do citoplasma, já que esta apresentava-se dispersa homoganeamente pelo mesmo (Figuras 14 A e G). Na linhagem HT144 observou-se marcação acentuada da proteína MT1-MMP na periferia do citoplasma nos grupos tratados com 100 nM de jaspamídeo seguido de 48 h de recuperação (Figura 14 F) e no grupo tratado com 50 nM de jaspamídeo (Figura 14 H). Nos grupos controle (Figura 14 D) e tratado com 100 nM sem recuperação (Figura 14 D) a marcação da enzima também é distribuída homoganeamente pelo citoplasma.

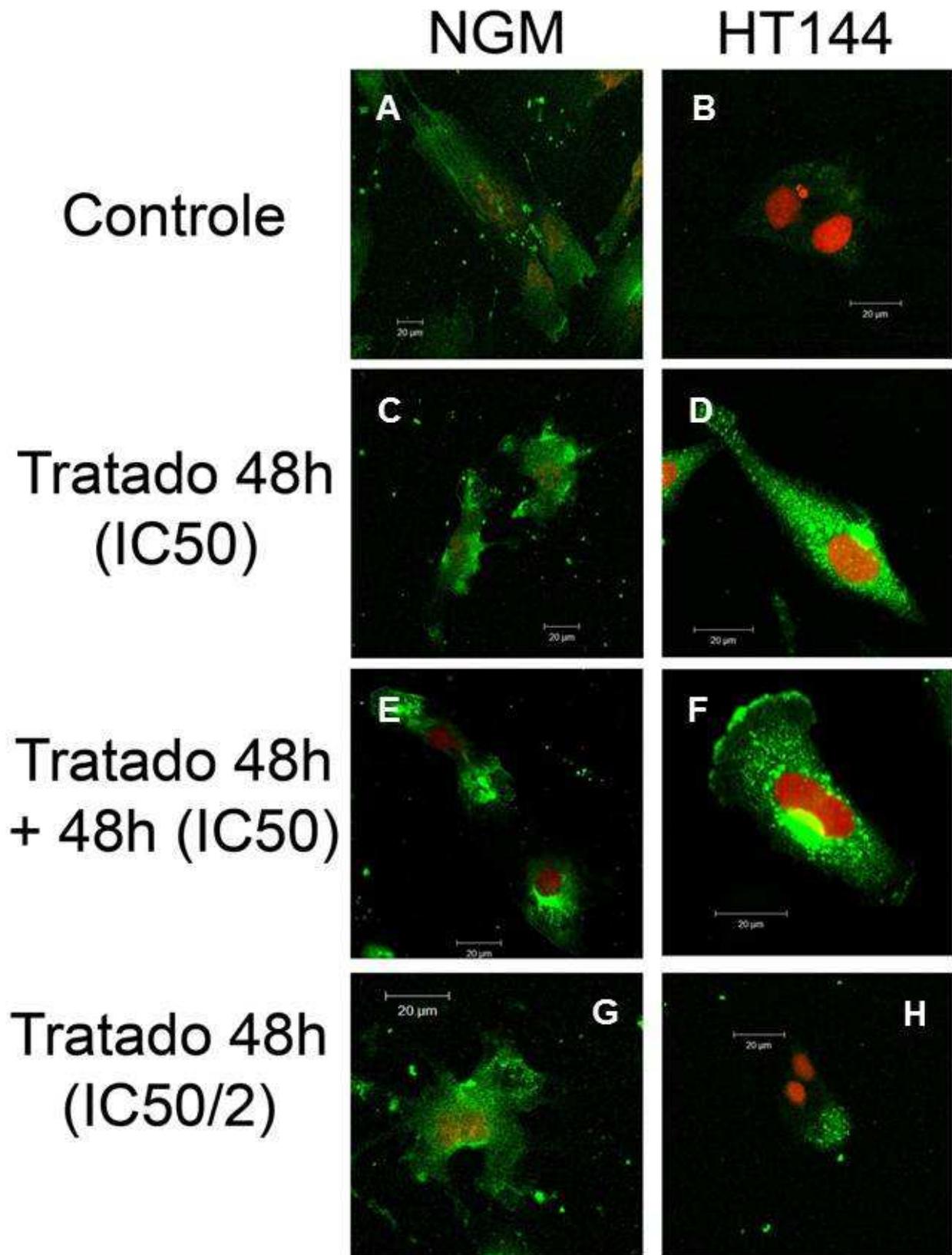


Figura 14 – Imagens obtidas ao microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 510) mostrando a localização da proteína MT1-MMP (verde) e o núcleo marcado com iodeto de propídeo (vermelho).

Com o intuito de conhecer as proteínas envolvidas nos fenômenos estudados no presente trabalho foi necessário entender não só a localização como também a

expressão da proteína MT1-MMP, já que os dados de imunofluorescência apontavam para um aumento na expressão da mesma (possivelmente evidenciado com o aparente incremento da positividade da reação nos grupos tratados das duas linhagens. Para tanto foram feitos ensaios de *Western blotting* não só para a enzima supracitada como também para a proteína IRSp53, envolvida na regulação da via Rac de migração. Para ambas as linhagens ocorreu diminuição da expressão da proteína IRSp53 no grupo tratado com IC50 quando comparada com a expressão dessa proteína no grupo controle, sendo que a diminuição foi menos evidente na linhagem NGM. Já a proteína MT1-MMP não apresentou variação de expressão em nenhuma das linhagens (Figura 15).

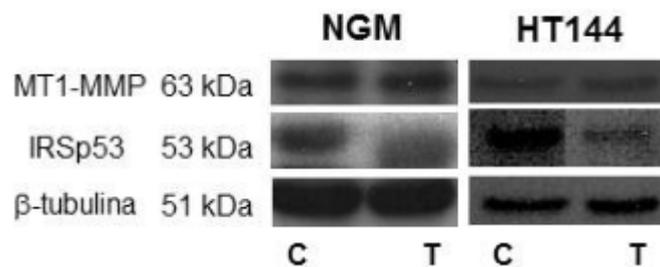


Figura 15 – Expressão das proteínas MT1-MMP e IRSp53 após tratamento por 48h com a concentração de jaspamídeo do IC50 das linhagens NGM e HT144.

Sabendo que os dados de *Western blotting* apontavam para a utilização da via Rac como principal sinalização de migração nas linhagens NGM e HT144 foram feitos ensaios de migração e invasão em placas de *transwell* com o tratamento com os inibidores das proteínas Rac e ROCK (efetora da via Rho). Quando tratadas com o inibidor da via de sinalização da proteína Rac as células NGM apresentaram diminuição estatisticamente significativa em relação ao controle para os grupos tratados com inibidor e jaspamídeo. Observou-se maior diminuição para a taxa de migração nos grupos tratados com 150 nM da droga (com e sem recuperação) em relação ao controle, mas sem diferença estatisticamente significativa entre si. O grupo tratado com apenas 75 nM de jaspamídeo apresentou redução da migração em relação ao controle e um aumento de migração em relação aos grupos tratados com o IC50 (Figura 16 A). Quando observamos os resultados de invasão foi possível notar que o grupo tratado com o inibidor apresentou diminuição da capacidade de invasão juntamente com os grupos tratador com o inibidor mais a droga nas concentrações de 150 e 75 nM em relação ao controle. Estes dois últimos grupos

tiveram uma taxa de migração maior do que o grupo tratado somente com o inibidor, mas entre si a taxa deste processo foi a mesma. Já o grupo tratado com o IC50 da droga seguido de recuperação não apresentou mudança estatisticamente significativa em relação ao controle (Figura 16 B).

Na linhagem HT144 a incubação com inibidor da proteína Rac não foi efetiva quanto à diminuição do processo de migração já que todos os grupos tratados apresentaram aumento estatisticamente significativo neste processo quando comparados ao controle. Além disso, não houve diferença entre as taxas de migração dos grupos tratados. Porém, para o processo de invasão, todos os grupos tratados apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao controle, sendo que não houve diferenças nas taxas de migração entre os grupos tratados (Figura 16 D).

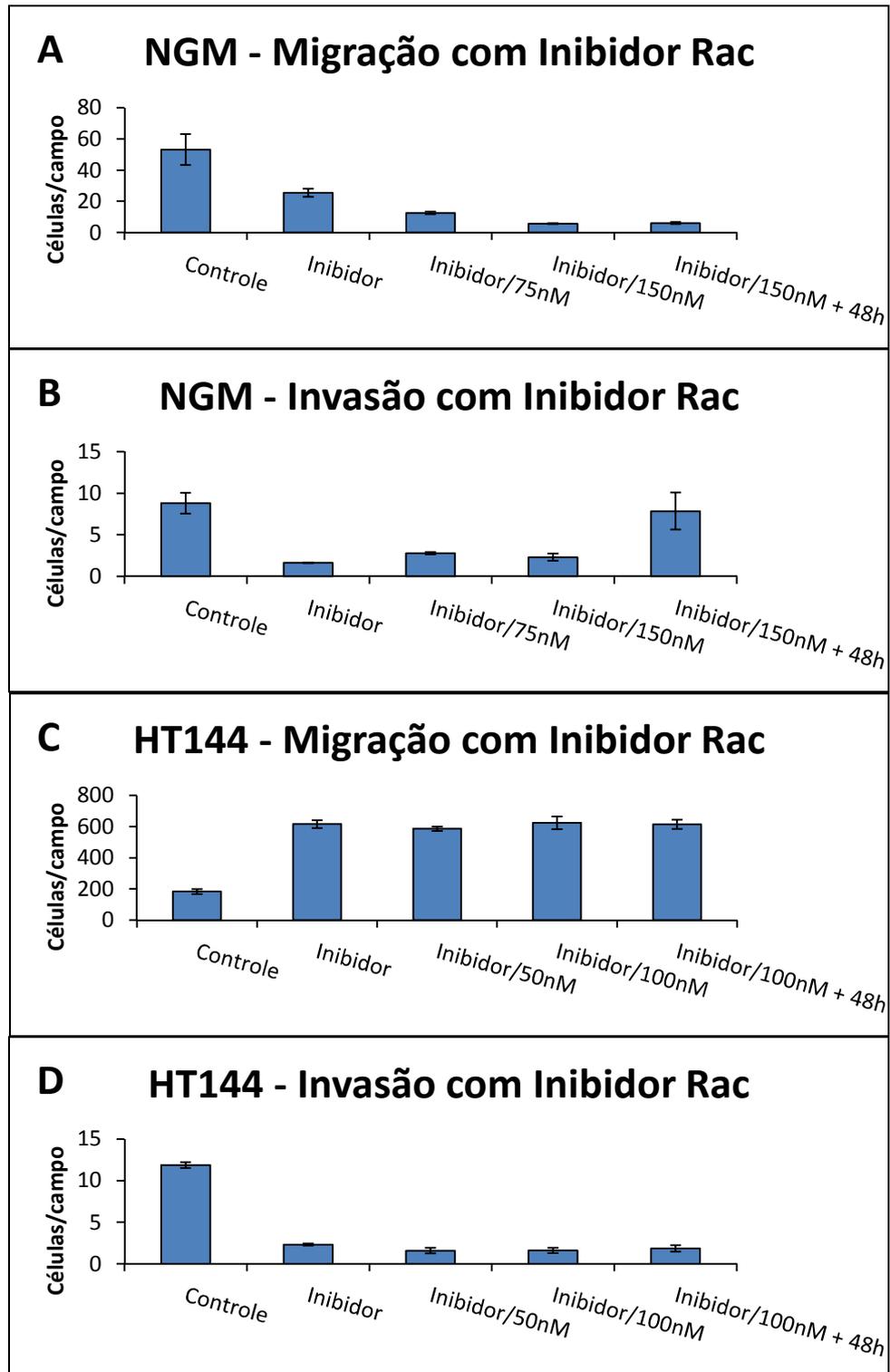


Figura 16 – Histogramas dos ensaios de migração em placas de *transwell* (gráficos A e C) e invasão (gráficos B e D) em câmara de Boyden para as linhagens NGM e HT144 utilizando inibidor da proteína Rac por 48 h mostrando o número de células por campo contadas na câmara inferior do placas de *transwell*.

Após o tratamento com o inibidor da proteína ROCK a linhagem NGM apresentou diminuição estatisticamente significativa para todos os grupos tratados com inibidor e com jaspamídeo, sendo que não houve diferença nas taxas de migração entre os mesmos. Houve também diminuição desse fenômeno no grupo tratado apenas com o inibidor (Figura 17 A). Quanto à invasão, nesta linhagem observou-se diminuição deste parâmetro nos grupos tratados apenas com inibidor e com inibidor seguido de 75 nM da droga em relação ao controle. Entre estes dois grupos não houve diferença estatisticamente significativa quanto à taxa de invasão. Os grupos tratados com 150 nM da droga não mostraram diferença nem entre si nem em relação ao controle (Figura 17 B).

Por fim, a linhagem HT144 apresentou aumento estatisticamente significativo da taxa de migração somente para o grupo tratado com inibidor seguido de 100 nM da droga em relação ao controle. Todos os grupos de tratamento tiveram sua taxa de migração estatisticamente igual ao controle (Figura 17 C). No entanto, observou-se diminuição significativa em relação ao controle da taxa de invasão para todos os grupos tratados, sendo que não houve diferença entre os tratamentos (Figura 17 D).

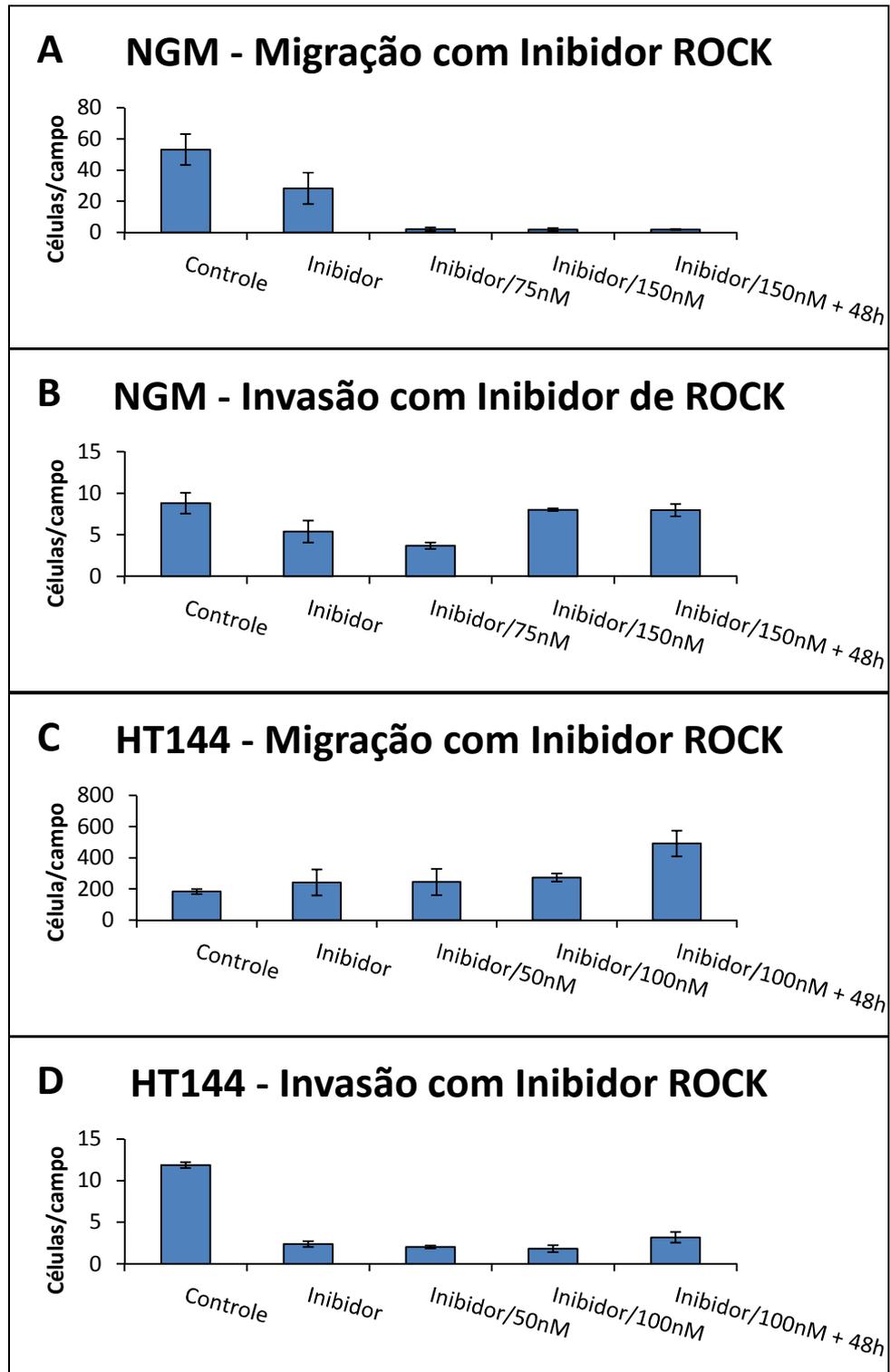


Figura 17 – Histogramas dos ensaios de migração em placas de *transwell* (gráficos A e C) e invasão (gráficos B e D) em câmara de Boyden para as linhagens NGM e HT144 utilizando inibidor da proteína ROCK por 48h mostrando o número de células por campo contadas na câmara inferior das placas de *transwell*.

5 DISCUSSÃO

Estudos científicos das últimas décadas mostram que muitas das drogas utilizadas no tratamento contra o câncer são derivadas de compostos naturais, e a busca por novas substâncias bioativas continua até hoje (KINGHORN; CHIN; SWANSON, 2009). Tais compostos podem ser de origem animal, vegetal ou obtidos a partir de microrganismos, sendo representadas por uma grande diversidade química de metabólitos secundários destes grupos. Sua produção deve estar associada a fatores ecológicos em que a toxicidade dos compostos formados tem caráter defensivo contra predadores ou parasitas, ou de ataque na competição por espaço ou captura da presa (MCCONNEL et al., 1994; WINK, 2003). Embora não seja claro qual a função do jaspamídeo para as espécies que o sintetizam, esta droga enquadra-se neste contexto (ZAMPELLA et al., 1999).

É importante ressaltar que o tratamento quimioterápico deve ser feito com uma dose pré-determinada de droga que não apresente grande citotoxicidade para o paciente (SEBAUGH, 2010). O primeiro passo na busca por este valor se dá através da determinação do índice de citotoxicidade (IC50), que em nosso caso será utilizado para determinação da concentração de droga responsável por diminuição de 50% na frequência de células (SEBAUGH, 2010). Para a determinação do IC50 das linhagens celulares NGM e HT144 foi feita uma pesquisa bibliográfica para determinar quais concentrações seriam testadas.

Devido à grande variação das concentrações utilizadas em diferentes trabalhos sobre jaspamídeos e compostos similares foram feitos testes com concentrações que variavam entre 50 nM a 800 nM. De maneira geral foi observada uma grande toxicidade das concentrações acima de 50 nM, já que esta molécula de grande polaridade (ANDAVAN et al., 2010) tem a capacidade de difundir-se passivamente através da bicamada lipídica da membrana celular (Dra. Marisa P. Prado, comunicação pessoal). Através da contagem das células sobreviventes por citometria de fluxo após 48 h de tratamento foi determinado que o valor de IC50 para a linhagem NGM era de 150 nM e 100 nM para a linhagem HT144.

Em estudos sobre o perfil genético de diferentes tipos de nevus melanocíticos congênitos foram observadas alterações significativas, como a super expressão de genes relacionados com a proteção do DNA (DDIT4, MT1A, MT1F, MT1G, MT1X, MT2A, PLK3, SMG1 e STC1), estresse oxidativo (RND3 e MAGST1) e

quimioresistência (ALDH1A1, BIRC7, CLU, GBP, MGST1 e TNFRSF12A) (DESSARS et al., 2009), fato que pode ser indicativo de uma maior resiliência ao tratamento com jaspamídeo das células NGM em relação às células HT144 de melanoma. Além disso, é importante lembrar que as células NGM possuem uma taxa de proliferação mais baixa que a da HT144, e nos períodos de tempo observados no presente trabalho as células de nevus azul apresentou efeitos mais brandos quanto ao tratamento com jaspamídeo.

Uma vez que foram observadas alterações morfológicas durante os tratamentos com a droga e sabendo-se que a mesma age nos microfilamentos (ZAMPELLA et al., 1999), foram pesquisadas possíveis mudanças que o tratamento com jaspamídeo causaria no citoesqueleto de actina. Isto posto, foi realizada a avaliação da morfologia das células através dos ensaios de citoquímica fluorescente, onde pode-se observar mudanças nos microfilamentos de ambas as linhagens após os tratamentos, corroborando os dados de diminuição na velocidade de migração provavelmente devido à dificuldade de reorganização dos microfilamentos. Outros autores já mostraram problemas na repolimerização da actina após exposição à mesma droga (TERRACCIANO et al., 2008).

As células estudadas possuem uma organização evidente dos microfilamentos em fibras tensionadas (*stress fibers*), o que é comumente observado em células em cultura 2D (CHHABRA; HIGGS, 2007). No grupo submetido ao tratamento com o IC50 por 48 h o arranjo de fibras tensionadas alterou-se em ambas as linhagens, sendo possível observar pequenos fragmentos de F-actina formando aglomerados localizados próximo ao núcleo. Tal característica manteve-se no grupo que sofreu tratamento com o IC50 seguido de 48 h de recuperação, porém, tais efeitos foram mais brandos. Assim, mostramos uma tendência das células a reassumirem morfologia semelhante à apresentada no grupo controle, indicando que os efeitos da droga são reversíveis quando o estímulo é retirado.

Após a exposição das linhagens à metade da concentração do IC50, a linhagem NGM não apresentou mudanças significativas em suas fibras tensionadas. Todavia, na linhagem HT144, os microfilamentos mostraram-se desorganizados, dispersos na região perinuclear, não sendo observada a formação de aglomerados. Este acúmulo é observado em fibroblastos de camundongos testados pelo grupo de Kashina (KARAKOZOVA et al., 2006), que demonstra que a adição do aminoácido arginina na porção N-terminal da actina, uma modificação pós-traducional, age

agregando esta molécula no citoplasma. Tal modificação foi ligada pelo autor não só como uma característica comum da organização e função do citoesqueleto celular *in vitro* como também foi relacionada com a marcação dos microfilamentos para posterior adição de ubiquitina e consequente degradação (KARAKOZOVA et al., 2006). Nosso grupo apresentou resultados semelhantes nas células HT-144 utilizando ácido cinâmico, um composto derivado de plantas, que possui efeito citotóxico preferencialmente em células tumorais devido, provavelmente, a seu potencial antioxidante (NIERO, 2010). Também foram vistas mudanças quanto à morfologia dos filamentos de actina das células de câncer da mama T47D e MCF7 tratadas com geodiamolídeo que se assemelham às anomalias observadas na linhagem HT144 tratada com jaspamídeo (RANGEL et al., 2006).

De posse da informação de que a droga altera significativamente a morfologia do citoesqueleto de actina foi necessário analisar os efeitos citotóxicos do tratamento, já que é conhecido o fato de que o jaspamídeo possui efeitos anti-proliferativos através da indução de morte celular programada via caspase 3 ou proteases em células T Jurkat humanas, fibroblastos murinos, células de linfoma e mieloma murino, além de células semelhantes a macrófagos murinos (ODAKA et al., 2000). Sendo assim foram feitos ensaios de apoptose por citometria de fluxo para que fosse determinado o índice apoptótico para cada linhagem celular.

Observa-se para as duas linhagens que o grupo tratado com metade do IC50 apresentou um número menor de células mortas por apoptoses em relação ao grupo controle, sendo essa diferença estatisticamente significativa apenas para o grupo tratado com 150 nM sem recuperação para a linhagem NGM. No entanto, há uma indicação positiva de possa haver ocorrido morte por necrose (marcação somente com iodeto de propídeo) nas populações tratadas com o IC50 para ambas as linhagens. A baixa taxa de populações de células que morrem por apoptose durante os tratamentos com jaspamídeo pode ser explicada pelo fato de que células de melanoma e nevus possuem características moleculares que atribuem resistência ao processo de morte programada. Dentre estes fatores estão as mutações na proteína p53 (que ocorrem em maior frequência em melanomas metastáticos do que em nevus iniciais), a super-expressão de Bax, Mcl-1, Bcl-XL, NF- κ B, survivina, ETB, integrina, ML-IAP (que é um inibidor de apoptose encontrado em melanomas malignos mas inexistente em melanócitos normais) e a menor expressão ou regulação negativa de fatores como Bcl-2 e TRAIL (HUSSEIN et al., 2003).

Sabendo que a maior parte das células que passam pelo tratamento com a droga permanecem vivas era necessário verificar a viabilidade celular das linhagens, o que foi feito através do ensaio com o kit ViaCount de citometria de fluxo. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e controle em nenhuma das linhagens, demonstrando que as células que permanecem vivas após o tratamento apresentam-se viáveis. Além disso, observa-se também um aumento na viabilidade celular do grupo tratado com 75 nM da linhagem HT144.

Sabendo que a maior parte das células permanecia viva e viável, as taxas de migração das duas linhagens foram avaliadas por ensaios de ferida. Como um dos efeitos do tratamento com jaspamídeo é a incapacidade de repolimerização do citoesqueleto de actina (ODAKA et al., 2000), e consequente dificuldade de migrar de maneira mesenquimal (KURISO et al., 2005) nestes ensaios as células foram tratadas com a droga nas concentrações do IC50 e IC50/2.

A modificação da morfologia das células (de fusiforme para arredondada) foi reversível, voltando ao normal após 48 h. Logo após a incubação com a droga nas concentrações de 100 nM e 50 nM as células HT144 apresentaram mudança considerável em sua morfologia, que passou de fusiforme para arredondada. Quarenta e oito horas após o tratamento as células voltaram a apresentar a morfologia normal. Este fato não foi observado em nenhum tratamento da linhagem NGM. Essas mudanças na forma das células após a incubação com drogas que interagem com o citoesqueleto são comumente observadas (GALA et al., 2007).

Para todas as linhagens o tratamento com as duas concentrações de droga foram efetivos para a diminuição da taxa de migração nos ensaios de ferida, sendo que os grupos tratados com a concentração de metade do IC50 apresentaram uma menor velocidade para a ocupação da área livre das feridas, sendo que a área livre 48 h após o tratamento com metade da concentração do IC50 é maior do que a mesma quando as células são tratadas com a concentração do IC50. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato de que o jaspamídeo age de maneira a dificultar a migração de diferentes tipos de células impedindo a repolimerização dos microfilamentos de actina necessários para a migração (ODAKA et al., 2000). Quando se movimentando de maneira mesenquimal as células são caracterizadas por uma morfologia alongada que requer proteólise extracelular localizada nas

protrusões celulares da frente de migração, fenômenos orquestrados pela via de sinalização Rac (SANZ-MORENO et al., 2008).

É importante ressaltar que a ocupação da área livre nos ensaios de ferida não se dá somente pela taxa de movimentação das células, mas também pela proliferação das linhagens, que conforme se dividem começam a ocupar os espaços vazios disponíveis. Sendo assim, foi necessária a utilização das placas de *transwell* que serviram não só para a verificação da migração como também para a análise da taxa de invasão.

O aumento da taxa de migração observado para a linhagem NGM após o tratamento com IC50 da droga pode ser explicado pela maior resistência dessa linhagem à toxicidade da droga, além de ser um indício de que as células possam ter mudado de estratégia migratória (de mesenquimal para ameboide), fato que é relativamente comum para alguns tipos de células (FRIEDL; GILMOUR, 2009) e é conhecido como transição mesenquimal-ameboide (TMA) (FRIEDL; WOLF, 2003).

Esta transição é acompanhada de uma série de modificações morfológicas e moleculares nas células, como a forma arredondada (resultado da diferente organização do citoesqueleto), a mudança na estratégia molecular e a distribuição alterada de integrinas. As mudanças morfológicas são resultantes da perda de adesão mediada por integrinas com subunidade $\beta 1$, o que não afeta a dinâmica do citoesqueleto, já que as células ainda conservam a capacidade de formar ondulações e pseudópodos. A TMA ocorre orquestrada por muitos fatores, dentre eles a anulação da proteólise pericelular (que pode ocorrer pela ação de inibidores), o enfraquecimento das interações da célula com a matriz extracelular e a inibição da via de sinalização das Rho-GTPases (FRIEDL; WOLF, 2003).

Na linhagem HT144 só foi observado aumento da taxa de migração para as células tratadas com metade do IC50, demonstrando que nesta concentração de droga ainda permita que as células dessa linhagem conseguissem migrar de maneira mesenquimal, visto que os tratamentos com uma concentração maior de jaspamídeo mostram-se demasiadamente tóxicas para que ocorra tal fenômeno, já que a linhagem HT144 é mais sensível à droga.

Este fato foi corroborado pela dificuldade encontrada por estas células em passar para a câmara inferior das placas de *transwell* após tratamento com a droga, onde apenas o grupo que teve 48 h de recuperação conseguiu completar o processo de invasão. Isto pode ser explicado pelos dados dos ensaios de citotóxicidade

fluorescente que mostraram a célula reorganizando o citoesqueleto de actina após a recuperação de 48 h em meio sem droga, o que possibilitaria a movimentação normal da célula.

As imagens obtidas por microscopia confocal da marcação da proteína MT1-MMP corroboram os dados da literatura. Sabe-se que análises histopatológicas de amostras de tumores humanos mostram que esta molécula não só é expressa em células de melanoma como também é localizada na frente de invasão de tumores primários (IIDA et al., 2004), e a marcação preferencialmente periférica no citoplasma evidencia não só a expressão dessa proteína como também o caráter móvel das linhagens NGM e HT144.

Sabendo que a proteína IRSp53 tem um papel importante no controle da migração mesenquimal, já que age na restrição espacial da sinalização, confinando as moléculas reguladoras de actina e gerando um *feedback* controlado que garante a produção univectorial de forças motrizes baseadas em actina, foram realizados ensaios de *Western blotting* com esta proteína. Seu papel consiste em traduzir o sinal ligando a deformação que ocorreu na membrana causada pela extensão dos pseudópodes com o citoesqueleto de actina localizado abaixo dessa porção da membrana (SCITA et al., 2008). Os resultados mostram a diminuição da expressão da proteína IRSp53 (que inibe a ação da proteína WAVE2 através da interação de seu domínio SH3 com a região rica em prolina da WAVE2, efetora de Rac1 no movimento de migração mesenquimal) (SCITA et al., 2008) em ambas as linhagens, apontam uma mudança de estratégia migratória das células, fato comum em alguns tipos de tumor (BINAMÉ et al., 2010). Ao encontrar dificuldades para repolimerizar os microfilamentos na frente de migração após o tratamento é possível que as células tenham mudado a estratégia de migração de mesenquimal para ameboide, já que neste processo a força motriz é advinda dos blebs de membrana que causam a pressão hidrostática necessária para o movimento, e não da repolimerização dos microfilamentos (BINAMÉ et al., 2010). Neste caso a migração ameboide seria facilitada pelo uso da droga, já que esta age impedindo que ocorra essa repolimerização (DERIVERY; GAUTREAU, 2010).

Embora a função exata das metaloproteinases na invasão tumoral e metástase ainda não seja inteiramente conhecida sabe-se que o aumento de expressão dessas enzimas foi ligado à progressão e invasão tumoral de melanomas (IIDA et al., 2004). Porém, nos ensaios de *Western blotting* do presente trabalho a

enzima MT1-MMP não apresentou aumento de expressão, embora as linhagens do ainda conservem a capacidade de migração e invasão. Porém, é conhecido o fato de que há uma considerável diminuição da expressão desta metaloproteinase em células que migram de maneira ameboide e conseqüentemente tem a via Rho ativada (BINAMÉ et al., 2010). Estes dados não concordam os de Lida et al. (2004), que postula que a expressão de MT1-MMP estimula a invasão do melanoma em matrizes em 3D compostas por matrigel.

Para a melhor investigação de qual via celular está guiando a movimentação das linhagens NGM e HT144 após o tratamento com jaspamídeo foram utilizados os inibidores das vias Rac e Rho (Tabela 3).

Tabela 3 – Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de placas de *transwell* utilizando inibidores de Rac e ROCK após o tratamento com jaspamídeo por 48 h nas linhagens NGM e HT144.

Célula	Tratamento	Migração	Invasão
NGM	Inibidor de Rac	Não ocorreu	Não ocorreu
	Inibidor de ROCK	Diminuiu	Diminuiu
	Inib. Rac+Jaspamídeo	Não ocorreu	Não ocorreu
	Inib. ROCK+Jaspamídeo	Não ocorreu	Aumentou
HT144	Inibidor de Rac	Aumentou	Não ocorreu
	Inibidoro de ROCK	Sem alterações	Não ocorreu
	Inib. Rac+Jaspamídeo	Aumentou	Não ocorreu
	Inib. ROCK+Jaspamídeo	Sem alterações	Não ocorreu

Como não há um inibidor conhecido da proteína Rho foi utilizado um inibidor de uma das principais proteínas efetoras desta via, a proteína ROCK (GADEA et al., 2007). Os dados de utilização dos inibidores de Rac mostram que a linhagem NGM utiliza preferencialmente esta via para a migração e invasão, sendo que pode mudar de estratégia migratória (de mesenquimal para ameboide, passando a utilizar a via Rho de sinalização), mas não de estratégia de invasão, já que a utilização do inibidor supracitado impede este fenômeno. Este fato foi corroborado pela inibição da proteína ROCK que diminui a taxa de migração sem interrompê-la.

Pode-se dizer ainda que o tratamento com jaspamídeo foi efetivo quanto ao impedimento da migração das células NGM. Neste caso o tratamento com a droga é efetivo, fato que é corroborado pelos grupos de tratamento que receberam o inibidor de ROCK e a droga. Porém, quando observamos a capacidade de invasão após o tratamento com inibidor de Rac vemos que esse fenômeno não ocorre, exceto no

grupo que sofre tratamento seguido de recuperação, pois somente este retoma sua capacidade de invadir o matrigel. O aumento da taxa de invasão após utilização do inibidor de ROCK retoma a idéia de que esta linhagem utiliza a via Rac para sua movimentação, sendo que o tratamento com jaspamídeo só é efetivo para o grupo tratado com a concentração de 75 nM da droga, já que esta é a única amostra que sofre redução da taxa de invasão.

Já para a linhagem HT144 é possível observar pelos dados de inibição da proteína Rac que a linhagem utiliza a via dessa molécula tanto para migrar quanto para invadir, sendo que possui capacidade de mudar de estratégia de migração, pois este fenômeno não só continua ocorrendo como também sofre aumento significativo. O uso de inibidor de ROCK corrobora esta hipótese, já que não diminui a movimentação destas células. Porém, o uso de qualquer um dos dois inibidores impede que ocorra invasão, apontando para o fato de que talvez as duas vias de sinalização sejam necessárias para que estas células possam invadir o matrigel. Outro fato importante a ser ressaltado é que foi visto pelo grupo de Roux (GADEA et al., 2007) que alterações na expressão de proteínas do ciclo celular podem promover alterações no comportamento de proteínas envolvidas na dinâmica do citoesqueleto de actina como pequenas Rho GTPases.

Sabendo que a via de sinalização de Rho faz parte da contração do citoplasma durante a migração mesenquimal (PANKOVÁ et al., 2010), tipo de movimentação que parece ser a dominante nas células HT144, a perda de função de ROCK através de um inibidor poderia não ter efeito, já que sua função de inibição da proteína MLCP (*myosin light chain phosphatase*) é sobreposta pela proteína efetora da via Cdc42 MRCK (*myotonic dystrophykinase-related Cdc42-binding kinase*), que também está ativa na migração mesenquimal. A inibição de MLCP impede a desfosforilação da MLC2 (*myosin light chain 2* que quando fosforilada aumenta a contratilidade celular) (PANKOVÁ et al., 2010).

Este dado foi observado em células BE de carcinoma de cólon e células SW962 de carcinoma escamoso, onde a primeira não teve sua contratilidade diminuída após a inibição da via Rho/ROCK por causa da sobreposição de função da proteína MRCK da via de Cdc42 (PANKOVÁ et al., 2010). Sendo assim, é possível que o mesmo tenha ocorrido nas células HT144, que teriam a contratilidade necessária para a invasão mesenquimal diminuída após o tratamento com inibidor de ROCK não por causa da supressão da via Rho, mas sim pela efetividade do

tratamento com jaspamídeo que teria um papel relevante no impedimento da invasão.

Isto posto, o tratamento com jaspamídeo não foi efetivo para impedir que estas células migrassem, e seu papel nos processos de invasão não pode ser determinado precisamente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização dos experimentos aqui expostos e da análise dos dados com estes adquiridos podemos realizar algumas inferências sobre a ação do jaspamídeo sobre a migração e invasão das linhagens celulares estudadas:

- As células da linhagem HT144 são mais sensíveis ao tratamento com jaspamídeo em relação às células NGM, fato exemplificado não só pelo seu menor valor de IC50 quanto pelas modificações estruturais mais evidentes.
- Foi verificado que o tratamento com jaspamídeo por 48 h não aumenta o número de células que sofrem apoptose em nenhuma das linhagens utilizadas;
- A incubação com a droga não diminui consideravelmente a viabilidade celular de nenhuma das linhagens estudadas;
- O citoesqueleto de actina é morfologicamente afetado pelo uso da droga sendo seu efeito reversível, já que após o período de 48 h de recuperação observa-se uma morfologia dos microfilamentos próxima da normal;
- O tratamento com o IC50 da droga diminui a taxa de migração nos ensaios de ferida de ambas as linhagens. O mesmo é observado para o tratamento com metade do IC50, sendo que nestes últimos ensaios as duas linhagens apresentam uma velocidade de migração menor em relação ao tratado com o IC50;
- As imunofluorescências com a proteína MT1-MMP mostram que sua localização é dispersa pelo citoplasma nos grupos controles formando depósitos em diferentes áreas do citoplasma das células tratadas em ambas as linhagens;
- A expressão da proteína IRSp53 é diminuída após o tratamento com jaspamídeo, sendo que a expressão da proteína MT1-MMP permanece inalterada para ambas as linhagens após tratamento com a concentração do IC50;
- Os dados de migração e invasão em placas de *transwell* analisados juntamente com os ensaios de *Western blotting* indicam que a

linhagem NGM utiliza prioritariamente a via Rac de sinalização para que estes processos ocorram, sendo que somente o tratamento com metade do IC50 da droga foi eficaz para impedir a invasão;

- Analisando os dados de migração e invasão em placas de *transwell* juntamente com os ensaios de *Western blotting* da linhagem HT144, observa-se que a migração destas células pode ocorrer tanto pela via de sinalização Rac como pela via Rho. O intercâmbio entre uma via e outra, gerando diferentes tipos de movimentação, é bem grande, não sendo impedido nem pelo tratamento com o jaspamídeo;
- A partir dos dados obtidos neste trabalho ainda não foi possível definir qual o tipo de via de sinalização é usada pela linhagem HT144 no processo de invasão celular.

REFERÊNCIAS¹

ANDAVAN, G. S. B.; LEMMENS-GRUBER, R. Cyclodepsipeptides from marine sponges: natural agents for drug research. **Mar. Drugs**, v. 8, p. 810-834, 2010.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 63, p. 8-18, 2001.

ARTYM, V. V. et al. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. **Cancer Res.**, v. 66, p. 3034-3043, 2006.

BAILLY, M.; CONDEELIS, J. Cell motility: insights from the backstage. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, p. E292-E294, 2002.

BALLESTREM, C. et al. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. **Mol. Biol. Cell**, v. 11, p. 2999-3012, 2000.

BINAMÉ, F. et al. What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. **Mol. Biosyst.**, v.6, p. 648-661, 2010.

BISSELL, M. J.; RADISKY, D. Putting tumours in context. **Nat. Rev. Cancer**, v. 1, p. 46-54, 2001.

CHHABRA, E. S.; HIGGS H. N. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. **Nat. Cell Biol.**, v. 9, p. 1110-1121, 2007.

CHIANG, A. C.; MASSAGUÉ, J. Molecular origins of cancer: molecular basis of metastasis. **New Engl. J. Med.**, v. 359, p. 2814-2823, 2008.

CIOCA, D. P.; KITANO, K. Induction of apoptosis and CD10/neutral endopeptidase expression by jaspamide in HL-60 line cells. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 59, p. 1377-1385, 2002.

CONDEELIS, J. et al. The great escape: When cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 695-718, 2005.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CORDON-CARDO, C.; PRIVES, C. At the Crossroads of inflammation and tumorigenesis. **J. Exp. Med.**, v. 190, p. 1367-1370, 1999.

DELACRUZ, E. M.; POLLARD, T. D. Kinetics and thermodynamics of phalloidin binding to actin filaments from three divergent species. **Biochemistry-US**, v. 35 p. 14054-14061, 1996.

DERIVERY, E.; GAUTREAU, A. Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. **Bioessays**, v. 32, p 119-131, 2010.

DESSARS, B. et al. Genotypic and gene expression studies in Ccongenital melanocytic nevi: insight into Inicial steps of melanotumorigenesis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 129, p. 139-147.

EBADA S. S. et al. Two new jaspamide derivatives from the marine sponge *Jaspis splendens*. **Mar. Drugs**, v. 7, P. 435–444, 2009.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, p. 629-635, 2002.

ELENBAAS, B.; WEINBERG, R. A. Heterotypic signaling between ephitelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. **Exp. Cell Res.**, v. 264, p. 169-184, 2001.

FESTA, N. C.; CUCÉ, L. C. **Manual de dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hyphotesis revisited. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 1-6, 2003.

FITZPATRICK, T. B.; BREATHNACH, A. S. The epidermal melanin unit system. **Dermatol. Wochenschr.**, v. 147, p. 481-489, 1963.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. **Nat. Med.**, v. 1, p. 27-31, 1995.

FOULDS, L. The experimental study of tumor progression: a review. **Cancer Res.**, v. 14, p. 327-339, 1954.

FREITAS, V. M. et al. The geodiamolide H, derived from brazilian sponge *Geodia corticostylifera*, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. **J. Cell. Physiol.**, v. 216, p. 583–594, 2008.

FRIEDL, P.; GILMOUR, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 10, p. 445-457, 2009.

FRIEDL, P.; WOLF K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nat. Rev.**, v. 3., p. 362-374, 2003.

GADEA, G. et al. Loss of p53 promotes RhoA–ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. **JCB**, v. 178, n. 1, p. 23-30, 2007.

GALA, F. et al. New jaspamide derivatives with antimicrofilament activity from the sponge *Jaspis splendans*. **Tetrahedron**, v. 63, p. 5212-5219, 2007.

GAVA, B. et al. Inhibition of B16 melanoma metastases with the Ruthenium Complex Imidazolium trans-Imidazoledimethylsulfoxidetetrachlororuthenate and Down-Regulation of tumor cell invasion. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 317, p. 284–291, 2006.

GLYNN, S. A. et al. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. **BMC Cancer**, v. 8, p. 1-9, 2008.

GRÜNERT, S. et al. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 657-665, 2003.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HILL, H. Z.; HILL, G. J. UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma. **Pigment Cell Res.**, v. 13, p. 140-144, 2000.

HOLBROOK, K. A. et al. The appearance, density and distribution of melanocytes in human embryonic and fetal skin revealed by the anti-melanoma monoclonal antibody, HMB-45. **Anat. Embryol.**, v. 180, p. 443-455, 1989.

HUSSEIN, M. R. et al. Apoptoses and melanoma: molecular mechanisms. **J. Phatol.**, v. 199, p. 275-288, 2003.

IIDA, J. et al. Membrane Type-1 Matrix Metalloproteinase Promotes Human Melanoma Invasion and Growth. **J. Invest. Dermatol.** v. 122, p. 167-176, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Definições de tipos de câncer.** Rio de Janeiro: INCA. 2010. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao> Acesso em 14 jul. 2011.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2006. **CA Cancer J. Clin.**, v. 56, n. 2, p. 106-130, 2006.

JIMBOW, K. et al. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. **J. Invest. Dermatol.**, v. 67, n. 1, p. 72-89, 1976.

KARAKOZOVA, M. et al. Arginylation of β -Actin regulates Actin Cytoskeleton and cell motility. **Science**, v. 313, p. 192-196, 2006.

KINCANNON J; BOUTZALE C. The physiology of pigmented nevi. **Pediatrics**, v. 104, p. 1042-1045, 1999.

KINGHORN, A. D. et al. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.**, v. 12, n. 2, p. 189-196, 2009.

KOBAYASHI, N. et al. Melanin reduces ultraviolet-induced DNA damage formation and killing rate in cultured human melanoma cells. **J. Investig. Dermatol.**, v. 101, p. 685-689, 1993.

KOCH, W.; CHEDEKEL, M. Photoinitiated DNA damage by melanogenic intermediates in vitro. **Photochem. Photobiol.**, v. 44, p. 703-710, 1986.

KURISO, S. et al. Rac-WAVE2 signaling is involved in the invasive and metastatic phenotypes of murine melanoma cells. **Oncogene**, v. 24, p. 1309-1319, 2005.

KURISO, S.; TAKENAWA, T. The WASP and WAVE family proteins. **Gen. Biol.**, v. 10, p. 226.1-226.226.9, 2009.

MCCONNELL, O. J. et al. The discovery of marine natural products with therapeutic potential. **Biotechnology**, v. 26, p. 109-173, 1994.

NGUYEN, D. X.; MASSAGUÉ, J. Genetic determinations of cancer metastasis. **Nat. Rev. Genet.**, v. 8, p. 341-352, 2007.

NIERO, E. L. O. **Efeitos do ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanoma em cultura: avaliação do potencial anti-tumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultra-violeta.** 2010. 120 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ODAKA, C. et al. Jasplakinolide induces apoptosis in various transformed cell lines by a Caspase-3-Like Protease-Dependent pathway. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 7, n. 6, p. 947-952, 2000.

PANKOVÁ, K. et al. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and invasiveness in tumor cells. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, p. 63-71.

POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, p. 453–465, 2003.

POLLARD, T. D.; COOPER, J. A. Actin, a central player in cell shape and movement. **Science**, v. 326, p. 1208-1212, 2010.

PRADO, M. P.. **Compostos citotóxicos extraídos de esponjas: citotoxicidade e mecanismo de ação sobre o citoesqueleto de células de tumor de mama em cultura.** 2007. 80 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RAMASWAMY, S. et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. **Nat. Genet.**, v. 33, p. 49-54, 2003.

RANGEL, M. et al. Cytoskeleton alterations induced by *Geodia corticostylifera* depsipeptides in breast cancer cells. **Peptides**, v. 66763, p. 1-11, 2006.

REZZE, G. G. et al. Dermastocopia: o método de análise de padrões. **Bras. Dermatol.**, v. 81, n. 3, p. 261-268, 2006.

ROBINSON, S. J. et al. New structures and bioactivity properties of Jasplakinolide (Jaspamide) analogues from marine sponges. **J. Med. Chem.**, v. 53, p. 1651-1661, 2010.

ROVINI, A. et al. Microtubule-targeted agents: when mitochondria become essential to chemotherapy. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1807, p. 679-688, 2011.

SANZ-MORENO, V. et al. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. **Cell**, v. 135, p. 510-523, 2008.

SCHOBBER, J. M. et al. Migration and actin protrusion in melanoma cells are regulated by EB1 protein. **Cancer Lett.**, v. 284, p. 30-36, 2009.

SCITA, G. et al. IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. **Trends in Cell Biol.**, v. 18, p. 52-60, 2008.

SEIKI, M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. **Cancer Lett.**, v. 194, p. 1-11, 2003.

SLOMINSKI A. et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol. Rev.**, v. 84, p. 1155-1228, 2004.

SMIT, N. P. M. et al. Melanin offers protection against induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts by UVB in cultured human melanocytes. **Photochem Photobiol.**, v. 74, p. 424-430, 2001.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-3151, 2003.

SIMPSON, C. D. et al. Anoikis resistance and tumor metastasis. **Cancer Lett.**, v. 272, p. 177-185, 2008.

SU, W. P. Malignant melanoma: basic approach to clinicopathologic correlation. **Mayo Clin. Proc.**, v. 72, p. 267-272, 1997.

TAKEUSHI, H. et al. Jaspakinolide: interaction with radiation and hyperthermia in human prostate carcinoma and Lewis lung carcinoma. **Cancer Chemoth. Pharm.**, v. 42, p. 491-496, 1998.

TERRACCIANO, S. et al. Synthesis, conformational analysis, and cytotoxicity of new analogues of the natural cyclodepsipeptide jaspamide. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 1325-1331, 2004.

TERRACCIOANO, S. et al. Synthetic and pharmacological studies on new simplified analogues of the potent actin-targeting Jaspamide. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 16, p. 6580-6588, 2008.

VEIEROD, M. B. et al. Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigimentary characteristics, and nevi. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 19, n. 1, p. 111-120, 2010.

VIAL, E. et al. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. **Cancer Cell**, v. 4, p. 67-79, 2003.

VIGNJEVIC, D.; MONTAGNAC, G. Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. **Semin. Cancer Biol.**, v. 18, p. 12-22, 2008.

WANG, J. M. et al. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. **J. Immunol. Meth.**, v. 220, p. 1-17, 1998.

WEERARATNA, A. T. et al. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. **Cancer Cell – Mon. Rev.**, v. 1, p. 279-288, 2002.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

WOLF, K. et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. **JCB**, v. 160, p. 267-277, 2003.

YAMAGUSHI, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Bioch. Bioph. Acta**, v. 1773, p. 642-652, 2007.

YAMASAKI, D. et al. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. **Cancer Sci.**, v. 96, p. 379-386, 2005.

ZAMPELLA, A. et al. New Jaspamide Derivatives from the Marine Sponge *Jaspis splendans* Collected in Vanuatu. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 332-334, 1999.