

Adam Arai Martens

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS ENANTIOMÉRICOS DE TELÚRIO
SOBRE A BIOLOGIA CELULAR DE MELANOMAS HUMANOS – ENFOQUE EM
MORFOLOGIA E PROCESSOS CELULARES**

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

São Paulo
2017

Adam Arai Martens

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE COMPOSTOS ENANTIOMÉRICOS DE TELÚRIO
SOBRE A BIOLOGIA CELULAR DE MELANOMAS HUMANOS – ENFOQUE EM
MORFOLOGIA E PROCESSOS CELULARES**

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria
Machado Santelli

Versão original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Arai Martens, Adam

Avaliação dos efeitos de compostos enantioméricos de telúrio sobre a biologia celular de melanomas humanos - enfoque em morfologia e processos celulares / Adam Arai Martens; orientadora Gláucia Maria Machado Santelli. -- São Paulo, 2017.

114 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Biologia Celular. 2. Melanoma Metastático .
3. Telúrio. 4. Organotelúrio. 5. Morfologia. I.
Machado Santelli, Gláucia Maria, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Adam Arai Martens

Título da Tese: Avaliação dos efeitos de compostos enantioméricos de telúrio sobre a biologia celular de melanomas humanos – enfoque em morfologia e processos celulares

Orientador(a): Gláucia Maria Machado Santelli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

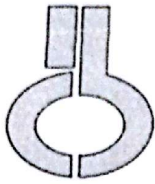
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 712/15 referente ao projeto intitulado: "*Avaliação dos efeitos de compostos enantioméricos de telúrio sobre a biologia celular de melanomas humanos-enfoque em morfologia e processos celulares*" sob a responsabilidade de **Adam Arai Martens**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 22 de maio de 2015.

PROF. DR. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador da CEUA - ICB/USP

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

Dedico esta tese a todas as pessoas que têm força e determinação para remar contra as piores das marés e ainda lutam por uma ciência de qualidade e por um país com ciência.

AGRADECIMENTOS

Durante esses exatos 5 anos em que fiz meu doutorado, o que não faltam são pessoas a quem agradecer, desde aquela pessoa que animou um dia ruim até aqueles momentos em que alguém literalmente salva sua vida acadêmica.

E às vezes a gente se acostuma a não deixar claro como as pessoas são importantes para nós. Não acredito que esse seja meu caso; durante minha trajetória, eu agradei, de forma verbal ou não-verbal, com um olhar ou um abraço (ou uma barra de chocolate) a vasta maioria das pessoas que me ajudaram e me deram força para seguir em frente.

E por isso não vou listar uma por uma.

O mesmo conceito se aplica às pessoas que pensam ter me ajudado, prefiro deixá-las nessa crença de que elas são realmente importantes, porque afinal não me faz diferença nenhuma.

AGRADECIMENTO AO APOIO FINANCEIRO

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 2015/03389-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo 310908/2013-2) pelo financiamento dos projetos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – BioCeM, e ao CNPq pelo apoio financeiro para a realização deste doutorado (Bolsa de doutorado processo 141781/2012-2), bem como, através da taxa de bancada, possibilitar a compra de materiais de consumo e a minha participação em dois congressos nacionais e um congresso internacional durante o período de desenvolvimento do projeto.

"Success in research needs four Gs:
Glück, Geduld, Geschick und Geld.
Luck, patience, skill and money."

Paul Ehrlich

RESUMO

MARTENS AA. **Avaliação dos efeitos de compostos enantioméricos de telúrio sobre a biologia celular de melanomas humanos – enfoque em morfologia e processos celulares.** [tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017

O melanoma metastático apresenta um alto grau de heterogeneidade em relação ao perfil de mutação em cada indivíduo, o que aumenta a dificuldade de sucesso no tratamento, com altos níveis de resistência e recidiva nos pacientes. Mesmo os avanços atuais nas áreas de medicina personalizada e imunoterapia não apresentaram a taxa de eficácia esperada no tratamento do melanoma. Estudos mostraram compostos de telúrio apresentando efeitos de seletividade em direção a células tumorais, poupando células saudáveis, chamado de efeito sensor efetor. Assim, testamos dois compostos orgânicos enantioméricos de telúrio (compostos RF-13R e RF-13S) sobre a biologia celular de linhagens de melanócitos (NGM) e melanoma metastático (HT-144, SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-147) com diferentes graus de comprometimento em genes importantes para o estabelecimento e desenvolvimento do câncer, variando de 1 a 3 genes mutados. Após determinar a aplicabilidade do composto através de ensaio de atividade hemolítica e determinar o IC₅₀ dos compostos para cada linhagem, experimentos de imunofluorescência mostraram seletividade para linhagens tumorais, evidenciando perda de morfologia característica, perda de volume citoplasmático e formação de projeções bolhosas de membrana, chamadas de *blebs*. Estes resultados foram corroborados pelo ensaio de microscopia em tempo real. Além disso, foram avaliados os processos de ciclo celular e morte celular das linhagens tumorais; o ensaio de ciclo celular mostrou dois perfis de parada em ciclo celular: bloqueio em G1 para as linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147 e bloqueio em G2/M para as linhagens SK-Mel-19 e HT-144. Já o ensaio de morte celular mostrou que as células expostas ao composto não morrem por ativação de caspase 9, embora não seja excluída a possibilidade de outros mecanismos de morte não avaliados. Diferentes parâmetros de migração celular (ensaio de fechamento de ferida, migração em *transwell*, velocidade e direcionalidade) mostraram comprometimento de migração associado à perda de adesão e morfologia característica. Juntamente aos aspectos celulares, avaliamos o possível efeito genotóxico dos compostos RF-13R e RF-13S e encontramos aumento de formação de micronúcleo somente na linhagem SK-Mel-28. Durante os diferentes experimentos também pudemos notar uma diferença na potência dos dois compostos: a forma RF-13S era capaz de induzir efeitos danosos em concentrações mais baixas que seu enantiômero na maior parte dos experimentos deste trabalho. Os resultados encontrados corroboram o efeito sensor efetor relatado na literatura para compostos de telúrio e colocam essas organotelúranas como promissoras drogas no tratamento de melanoma metastático.

Palavras-chave: Melanoma metastático. Telúrio. Organotelúrio. Biologia celular. Morfologia.

ABSTRACT

MARTENS AA. **Evaluation of the effects of enantiomeric tellurium compound on the cell biology of melanomas – focus in morphology and cellular processes.** [Ph. D. thesis (Cell and Tissue Biology)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Metastatic melanoma displays a high degree of heterogeneity regarding the mutation profile in each subject, which increases the difficulty for the success of treatment, showing high levels of resistance and relapse in patients. Even the current advancements in the field of personalised medicine and immunotherapy have not shown the expected efficacy levels on the treatment of melanoma. Studies show tellurium compounds displaying selective effects towards tumour cells, sparing healthy ones, called sensor effector effect. Thus, we tested two enantiomeric organic tellurium compounds (compounds RF-13R and RF-13S) on the cell biology of a melanocyte cell line (NGM) and metastatic melanoma cell lines (HT-144, SK-Mel-19, SK-Mel-28 and SK-Mel-147) with different degrees of compromise in genes important for the establishment and development of cancer, varying from one to three mutated genes. After determining the applicability of the compounds by a haemolytic activity assay and determining the IC₅₀ of the compounds for each cell line, immunofluorescence experiments showed selectivity for tumour cell lines, evidenced by loss of typical morphology, loss of cytoplasmic volume and formation of membrane blebs. These results were corroborated by the time lapse microscopy assay. Besides, we evaluated the processes of cell cycle and cell death of tumour cell lines; cell cycle assay show two different profiles of cell cycle blockade: G1 blockade for SK-Mel-28 and SK-Mel-147 and G2/M blockade for SK-Mel-19 and HT-144. On the other hand, the cell death assay showed that cells exposed to the compounds do not die by caspase 9 activation, although we cannot exclude the possibility of other cell death mechanisms not evaluated. Different cell migration parameters (wound healing assay, transwell migration, velocity and directionality) showed migration compromise associated with loss of cell adhesion and typical morphology. Along with cellular aspects, we evaluated the possible genotoxic effect of compounds RF-13R and RF-13S, and found increased formation of micronuclei only in cell line SK-Mel-28. During the study, different experiments showed difference in the potency of the compounds: RF-13S was able to induce deleterious effects in lower concentrations than its enantiomer in most of the assays performed in this work. The results found herein corroborate the sensor effector capability associated with tellurium compounds found in literature and set those organotellurium compounds as promising drugs for the treatment of metastatic melanoma.

Keywords: Metastatic melanoma. Tellurium. Organotellurium. Cell Biology. Morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula estrutural dos enantiômeros RF-13R e RF-13S.....	28
Figura 2 – Fotomicrografia das linhagens celulares utilizadas neste trabalho.....	32
Figura 3 – Ensaio de atividade hemolítica para os compostos RF-13R e RF-13S.....	39
Figura 4 – Determinação da concentração inibitória IC ₅₀ dos compostos RF-13R e RF-13S sobre as diferentes linhagens celulares analisadas.....	41
Figura 5 – Imagens de imunofluorescência da linhagem NGM sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM.....	45
Figura 6 – Imagens de imunofluorescência da linhagem HT-144 sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM.....	46
Figura 7 – Imagens de imunofluorescência da linhagem SK-Mel-19 sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM.....	47
Figura 8 – Imagens de imunofluorescência da linhagem SK-Mel-28 sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM.....	48
Figura 9 – Imagens de imunofluorescência da linhagem SK-Mel-147 sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM.....	49
Figura 10 – Fotomicrografias de contraste de fase de células representativas de cada população do ensaio de circularidade.....	51
Figura 11 – Parâmetro analisado pelo software do aparelho Amnis (GE) para a determinação do grau de circularidade da célula.....	51
Figura 12 – Análise morfométrica de células da linhagem SK-Mel-147.....	52
Figura 13 – Fotomicrografias de células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM.....	55
Figura 14 – Fotomicrografias de células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM.....	56
Figura 15 – Ciclo celular da linhagem HT-144.....	60
Figura 16 – Ciclo celular da linhagem SK-Mel-19.....	61
Figura 17 – Ciclo celular da linhagem SK-Mel-28.....	62
Figura 18 – Ciclo celular da linhagem SK-Mel-147.....	63

Figura 19 – Modelo de gráfico de avaliação de apoptose por kit Guava® Caspase Kit.....	65
Figura 20 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-28 nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M.....	68
Figura 21 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-147 nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M.....	69
Figura 22 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-19 nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M.....	70
Figura 23 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-28 nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M.....	71
Figura 24 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-147 nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M.....	72
Figura 25 – Exemplo de ensaio de fechamento de ferida.....	75
Figura 26 – Ensaio de fechamento de ferida na linhagem SK-Mel-28 tratada com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M.....	76
Figura 27 – Ensaio de fechamento de ferida na linhagem SK-Mel-147 tratada com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M.....	76
Figura 28 – Fotomicrografia de células coradas com cristal violeta aderidas à face inferior da membrana de policarbonato, visualizado em microscópio invertido de contraste de fase.....	77
Figura 29 – Ensaio de migração em <i>transwell</i> para células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB.....	78
Figura 30 – Ensaio de migração em <i>transwell</i> para células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB.....	79
Figura 31 – Avaliação da direcionalidade de células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB.....	81
Figura 32 – Avaliação da direcionalidade de células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB.....	81
Figura 33 – Avaliação da velocidade de células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB.....	82

Figura 34 – Avaliação da velocidade de células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM em 1% de SFB.....	82
Figura 35 – Fotomicrografia das alterações nucleares analisadas.....	83
Figura 36 – Frequência das alterações nucleares em células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com o composto RF-13R nas concentrações de 50 nM e 100 nM	85
Figura 37 – Frequência das alterações nucleares em células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com o composto RF-13S nas concentrações de 50 nM e 100 nM	85
Figura 38 – Frequência das alterações nucleares em células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com o composto RF-13R nas concentrações de 50 nM e 100 nM	86
Figura 39 – Frequência das alterações nucleares em células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com o composto RF-13S nas concentrações de 50 nM e 100 nM	86
Figura 40 – Frequência das alterações nucleares em células da linhagem HT-144 tratadas com o composto RF-13R nas concentrações de 50 nM e 100 nM.....	87
Figura 41 – Frequência das alterações nucleares em células da linhagem HT-144 tratadas com o composto RF-13S nas concentrações de 50 nM e 100 nM.....	87
Figura 42 – Frequência de micronúcleos nas linhagens HT-144, SK-Mel-28 e SK-Mel-147 após tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 50 nM e 100 nM.....	88
Figura A1 – Fotomicrografia de células tratadas com diferentes compostos.....	114

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Listagem de mutações nos genes mais incidentes em melanomas nas diferentes linhagens.....29
- Tabela 2** – IC₅₀ dos compostos RF-13R e RF-13S para as linhagens celulares após tratamento pelo período de 24 horas.....40
- Tabela 3** – Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular para as diferentes linhagens celulares após o tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM.....59
- Tabela 4** – Perfil de morte celular programada nas linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147 após tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 1 µM e 5 µM.....66
- Tabela 5** – Perfil de morte celular programada nas linhagens SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-147 após tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM.....68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 CÂNCER.....	17
1.2 MELANOMA.....	18
1.3 TERAPIAS CONTRA MELANOMA.....	20
1.4 TELÚRIO.....	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 COMPOSTOS DE TELÚRIO.....	28
3.2 LINHAGENS CELULARES	28
3.3 ENSAIO DE HEMÓLISE.....	30
3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE POR MTS – IC ₅₀	31
3.5 IMUNOFUORESCÊNCIA.....	32
3.6 ANÁLISE DE CIRCULARIDADE.....	32
3.7 MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA EM TEMPO REAL.....	33
3.8 CICLO CELULAR.....	33
3.9 MORTE CELULAR.....	34
3.10 ENSAIO DE MIGRAÇÃO – FECHAMENTO DE FERIDA.....	35
3.11 ENSAIO DE MIGRAÇÃO – <i>CELL TRACKING</i> POR MICROSCOPIA EM TEMPO REAL.....	35
3.12 ENSAIO DE MIGRAÇÃO – <i>TRANSWELL</i>	36
3.13 ENSAIO DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (CBMN).....	36
4 RESULTADOS	38
4.1 ENSAIOS PRÉ-ANALÍTICOS	39
4.2 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – IMUNOFUORESCÊNCIA.....	42
4.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA – CIRCULARIDADE.....	50
4.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – MICROSCOPIA EM TEMPO REAL.....	53
4.5 CICLO CELULAR.....	57
4.6 MORTE CELULAR.....	64
4.7 ENSAIO DE FECHAMENTO DE FERIDA.....	73
4.8 MIGRAÇÃO EM <i>TRANSWELL</i>	77
4.9 <i>TIME LAPSE</i> – DIRECIONALIDADE E VELOCIDADE.....	79
4.10 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE	83
5 DISCUSSÃO	89
5.1 ENSAIOS PRÉ-ANALÍTICOS.....	90
5.2 MORFOLOGIA.....	92
5.3 PROCESSOS CELULARES	93
5.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS – MICROSCOPIA EM TEMPO REAL.....	99
5.5 GENOTOXICIDADE.....	100
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer está entre os maiores causadores de morbidade e mortalidade ao redor do mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes relacionadas ao câncer em 2012; e projeta-se que o número de casos aumente em aproximadamente 75% mundialmente em duas décadas, atingindo a marca de 25 milhões de novos casos¹.

A ocorrência de câncer remonta à multicelularização dos organismos, embora não muitas evidências tenham resistido aos danos do tempo. O registro de tumor mais antigo em humanos até o presente momento é de um osteosarcoma de quase dois milhões de anos atrás (1,98 milhões de anos) encontrado nos fósseis da sexta vértebra torácica de um menino de 12 ou 13 anos de idade². Já a descrição documental mais antiga de câncer em humanos data de 3000 A.C., em um escrito egípcio de cirurgia (chamado Papiro Cirúrgico de Edwin Smith) atribuído a Imhotep, o mais antigo médico conhecido. Nele estão descritos alguns casos de tumores e ulcerações: um dos casos (caso 45) relata o exame de um homem com um tumor inchado na mama, que se apresentava frio ao toque, sem febre; o tumor também não apresentava granulação e secreção de fluidos. Quanto ao tratamento, o escrito simplesmente dizia: “Não há nenhum. Se vós encontrardes tumores inchados em qualquer membro de um homem, deveis tratá-lo de acordo com aquelas orientações”, o que provavelmente indica que o tratamento era a ausência de tratamento³.

Acredita-se que o nome câncer tenha sido cunhado pelo médico grego Hipócrates (460-370 A.C. – considerado o pai da medicina) que, para descrever os tumores ulcerativos e não-ulcerativos que encontrava em seus pacientes, usou o termo “karkinos” (καρκινος – caranguejo, em grego), pois os tumores malignos apresentavam vasos dilatados ao seu redor que lembravam a forma de um caranguejo enterrado na areia com as pernas distribuídas em círculo⁴.

Atualmente, células cancerosas são definidas por duas peculiares propriedades: escape dos mecanismos de controle da homeostase do tecido, promovendo crescimento e proliferação celular, e pela capacidade de invadir e colonizar territórios não-autólogos⁵. Entretanto, essa definição é muito simplista, e a cada ano o conhecimento da complexidade dos eventos inter- e intracelulares no câncer aumenta. Um exemplo disso são as revisões de Hanahan e Weinberg que, em 2000, listavam 6 *hallmarks* do câncer, sendo eles: (I) evasão de apoptose,

(II) auto-suficiência em fatores de crescimento, (III) insensibilidade para sinais anti-proliferativos, (IV) invasão tecidual e metástase, (V) potencial replicativo ilimitado e (VI) neoangiogênese sustentada⁶; onze anos depois, os mesmos autores revisitaram essa lista e acrescentaram 4 novos aspectos: (VII) desregulação energética celular, (VIII) evasão de sistema imune, (IX) inflamação promovida pelo tumor e (X) instabilidade genômica e mutação⁷. Possivelmente, futuras análises permitirão a adição de ainda mais características, dado o complexo *cross-talk* que existe entre diferentes inibidores, ativadores e mediadores de vias de sinalização envolvidas com o desenvolvimento e estabelecimento do câncer.

1.2 MELANOMA

Dentre os cânceres, o câncer de pele é o tipo de câncer mais comum entre a população branca mundialmente, e pode ser dividido em duas categorias: não-melanoma (carcinoma de célula basal – BCC, e carcinoma de célula escamosa – SCC, além de alguns tipos mais raros de câncer de pele) e melanoma maligno. Dentre estes, o melanoma maligno cutâneo é o câncer com maior crescimento de incidência na população branca, dobrando a incidência a cada 10-20 anos⁸. A alta incidência de melanoma, principalmente em caucasianos residentes próximos ao equador⁹, e a dificuldade de tratamento em seu estágio avançado o tornam um grande problema de saúde pública: embora represente somente 2-4% dos casos de câncer de pele, o melanoma é responsável por 80% de todas as mortes por câncer de pele. A taxa de sobrevivência após 5 e 10 anos para pacientes com melanoma tratado em estágios iniciais é de 90 e 91%, respectivamente; entretanto, pacientes com melanoma metastático apresentam somente 16% de taxa de sobrevivência após 5 anos¹⁰. Por essa razão, torna-se importante o estabelecimento de terapias que possam sensibilizar estas células sistemicamente.

Apesar de os principais fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma serem histórico familiar, presença de *nevi* e melanoma prévio, o *background* de mutações de cada melanoma também se apresenta como um fator importante na progressão da doença, bem como em seu tratamento. O melanoma pode ser caracterizado com base em padrões histológicos de progressão (modelo de Clark): *nevus* benigno, *nevus* displásico, fase de crescimento radial, fase de crescimento vertical e melanoma metastático. O *nevus* benigno é uma proliferação de melanócitos normais e compreende uma lesão benigna; quando há um aumento aberrante

de proliferação no *nevus* benigno ou em uma nova localidade, com presença de células atípicas e lesões assimétricas com bordas irregulares, chamamos de *nevus* displásico. Posteriormente, durante a fase de crescimento radial, essas células adquirem a capacidade de proliferar dentro dos limites da epiderme, e evoluem de uma atipia para um fenótipo canceroso, podendo adentrar papilas dérmicas na epiderme; então, as lesões passam à fase de crescimento vertical, em que adquirem a habilidade de degradar a membrana basal e invadir a derme, formando um nódulo de maior volume¹¹. Em estudos posteriores, pesquisadores associaram cada estágio de progressão a uma carga de mutações, com mutações em BRAF ainda na fase de *nevus* benigno, perda de CDKN2A e PTEN na fase displásica, aumento de CD1 na fase de crescimento radial e perda de expressão de E-caderina, expressão de N-caderina, integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$, MMP2 e survivina na fase de crescimento vertical¹².

Outro método de classificação é o TNM (adotado pela AJCC – Junta Americana em Câncer), que se baseia na espessura do tumor primário (T – T1 a T4), número de nodos metastáticos envolvidos (N – N0 a N3) e localização dos sítios de metástase (M – M0, M1a, M1b e M1c)¹³. Entretanto, clinicamente, o melanoma é dividido em 4 estágios: no estágio I estão os tumores primários, e este é dividido em subgrupos (IA e IB), baseados na disseminação pelas papilas dérmicas; no estágio II (subdividido em IIA, IIB e IIC), estão os casos com aumento na profundidade da lesão primária (maior invasividade); o estágio III (também subdividido em IIIA, IIIB e IIIC) compreende pacientes com inchaço dos linfonodos regionais ou comprometimento nodal contralateral; pacientes com metástases distantes são considerados estágio IV¹⁴.

Os melanócitos são células dendríticas produtoras de melanina – pigmento que dá cor a olhos, pele e anexos em vertebrados. Na pele, eles ficam localizados na camada basal da epiderme, onde proliferam muito pouco e estabelecem uma razão de 1:5 com queratinócitos basais¹⁵. Essa relação é muito intrincada, com os queratinócitos estabelecendo uma regulação parácrina sobre os melanócitos através da secreção de diferentes fatores de crescimento e citocinas que regulam crescimento, sobrevivência, adesão, migração e diferenciação dos melanócitos¹⁶. Em contraposição, os melanócitos estimulados produzem vesículas de melanina – chamados melanossomos – que são excitados e imediatamente internalizados pelos queratinócitos adjacentes, protegendo seus núcleos contra os efeitos deletérios causados pela radiação UV¹⁷.

Os melanoblastos, células precursoras de melanócitos, têm origem na crista neural – porção do ectoderma que liga o tubo neural e o ectoderma epidérmico; durante o processo de neurulação, essa população de células (células da crista neural que darão origem aos melanócitos) sofre transição epitélio-mesenquimal e delamina, migrando dorso-ventralmente e dorso-lateralmente através de um processo heterogêneo e complexo para todas as partes do ectoderma epitelial, a fim de colonizar toda a epiderme do indivíduo¹⁸.

Segundo Virchow¹⁹, “Neoplasias surgem segundo a mesma lei que regula o desenvolvimento embrionário”. Devido ao caráter altamente migratório dos melanoblastos e seu alto grau de interação com o ambiente extracelular, o melanoma – tumor maligno de melanócitos – apresenta uma maior facilidade de reativação desse fenótipo, com alto potencial de agressividade e invasão tecidual e migração, ou seja, maior potencial metastático. Para que realizem esse processo, as células devem perder a adesão célula-célula e célula-matriz, degradar a matriz extracelular, e realizar a transmigração para a derme, onde se infiltram em vasos e migram para sítios distantes²⁰. Estes processos envolvem extensivos rearranjos do citoesqueleto e geração de polaridade celular, promovido por vias de sinalização (como a via das Rho-GTPases Rho/Rac/CDC42), receptores de membrana (como as integrinas e receptores de fatores de crescimento) e interações com a matriz extracelular (revisado em Pandya et al.²¹).

A facilidade de metastatização torna interessante a busca de drogas que tenham a capacidade de inibir o potencial metastático de células de melanoma, atuando sobre elementos do citoesqueleto, metaloproteinases de matriz e diminuindo o potencial angiogênico²². Entretanto, a terapia para tratamento de melanomas ainda hoje se apresenta muito problemática, pois os índices de recidiva após os tratamentos utilizados atualmente ainda são muito altos.

1.3 TERAPIAS CONTRA MELANOMA

O quimioterápico mais comumente utilizado para o tratamento de melanomas metastáticos é o dacarbazine, um agente alquilante citotóxico aprovado pelo FDA (órgão estadunidense de regulamentação de drogas e alimentos – equivalente à nossa ANVISA) em 1975 ,que

apresentou taxas de respostas de 20% para pacientes com melanoma metastático, sendo desde então considerado o regime de tratamento padrão contra o qual são comparados novos compostos, sendo considerado o grupo controle até mesmo nas pesquisas clínicas de terapias alvo-dirigidas e imunoterapias²³. Um levantamento com 30 testes clínicos com novos agentes quimioterápicos ou combinações de tratamentos comparados com o tratamento somente com dacarbazine não mostrou melhoras nos índices de resposta ao tratamento e sobrevivência, o que levou este composto a permanecer por tanto tempo como droga de escolha para o tratamento dessa doença²⁴.

Uma das maiores limitações no tratamento do melanoma metastático é que a complexidade genética dos tumores de melanoma é muito grande. Diferentes grupos de pesquisa mostraram que melanomas originários de diferentes regiões do corpo apresentam diferentes mutações e níveis de expressão de determinados oncogenes, determinando assim subgrupos de melanomas de acordo com um padrão genético^{25,26}, podendo apresentar até diferentes populações dentro de um mesmo tumor²⁷. Essa variabilidade genética está sendo atualmente abordada com o intuito de desenhar drogas que atuem especificamente em proteínas do ciclo celular, intermediários de vias de sinalização, receptores e outros, que estejam mutados naquele subtipo ou subpopulação de melanoma, permitindo terapias individualizadas²⁸. Um grande avanço era esperado com o desenvolvimento de drogas altamente direcionadas inibidoras de isoformas mutadas de proteínas específicas, como o vemurafenib e o dabrafenib – que inibem a forma mutada BRAF^{V600E}, presente em quase metade dos casos de melanoma metastático²⁹. Entretanto, apesar de as respostas iniciais serem muito positivas, apresentando uma regressão tumoral rápida, a recidiva acontecia após 6 a 7 meses, com desenvolvimento de resistência ao tratamento; um estudo de caso mostrou focos de metástase de melanoma adquirindo mutações em outros genes após um esquema de tratamento com vemurafenib, trametinib (inibidor de MEK) e vemurafenib+trametinib, com desenvolvimento de mutação na proteína NRAS^{G13R} [30], o que realça a necessidade de pesquisa de novas drogas e mecanismos de tratamento de melanoma metastático.

Mais recentemente, o desenvolvimento de anticorpos capazes de suprimir o bloqueio imune promovido pelas células tumorais no organismo abriu uma nova janela de possibilidades para o tratamento de melanoma. O primeiro alvo dessa abordagem foi a molécula CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), um receptor encontrado na superfície de

células T ativadas; quando ligado a uma proteína ativadora, CTLA-4 induz uma *downregulation* dessas células, diminuindo a resposta imune do indivíduo frente o câncer; assim sendo, o anticorpo monoclonal ipilimumab se liga competitivamente ao receptor CTLA-4 e inibe sua ativação, liberando o organismo dessa supressão imune induzida pelo câncer, aumentando a sobrevivência e atividade dos linfócitos T no combate às células tumorais³¹.

Embora os avanços sejam visíveis, o caminho para o desenvolvimento de um esquema de tratamento efetivo contra o melanoma ainda é muito tortuoso: um estudo recente mostrou que a terapia combinada de vemurafenib (inibidor de via de sinalização) e ipilimumab (imunoterapia), que poderia garantir maior sucesso contra as células tumorais, apresentou o desenvolvimento de hepatotoxicidade grave nos pacientes em estudos de fase 1, sendo encerrado prematuramente³².

1.4 TELÚRIO

Telúrio é um elemento químico raro não-essencial da família dos calcogênios, que também abrange oxigênio, enxofre, selênio e polônio; e por muito tempo foi considerado tóxico e sem nenhuma atividade biológica. Ele raramente é encontrado em seu estado livre, normalmente fazendo parte de outros minérios, sendo que grande parte do telúrio comercial é recuperado do lodo do refinamento de cobre e é usado em diversas áreas industriais, como indústria química (catalisador, cobertura metálica, pigmentação), tecnológica (células solares de calculadoras e câmeras), automotiva (vulcanização de borracha e como componente de células de energia)³³, além do seu uso mais recente na área médica diagnóstica (fazendo parte de *quantum dots* – nanoestruturas usadas para rastrear e imagear macromoléculas em uma célula ou células em um tecido)^{34,35} e terapêutica, que será discutido adiante.

Diferente do selênio, que é encontrado na composição de proteínas – chamadas de selenoproteínas – em bactérias, aves e mamíferos³⁶, não há ocorrência natural de telurometioninas e telurocisteínas, devido às características químicas do telúrio, sendo encontrado em bactérias, fungos e leveduras somente como resultado da incorporação errônea de telúrio no lugar de enxofre e selênio³⁷. Entretanto, verificou-se que selenoproteínas e selenocompostos de baixo peso molecular reduzem o risco de câncer em

camundongos³⁸; assim como no caso do selênio, foi visto que compostos de organotelúrio têm-se provado menos tóxicos e com mais aplicações do que se considerava³⁹.

Dentre os compostos de telúrio, podemos dividi-los em três categorias: nanoestruturas, compostos inorgânicos, e compostos orgânicos. Nanoestruturas de telúrio, como nanoredes⁴⁰ e nanobastões^{41,42} apresentaram citotoxicidade contra células tumorais e indução de apoptose, se apresentando como potenciais terapias anticâncer, mas também levantando a questão da exposição ocupacional de trabalhadores que mantêm contato direto com esses nanomateriais gerados durante processos de extração, purificação ou produção de equipamentos e materiais que usem este composto.

Alguns complexos contendo telúrio, como o composto orgânico (3E)-4-cloro-3-[dicloro(4-metoxifenil)telanil]-2-metilbut-3-en-2-ol (chamado de RT-04) e o composto inorgânico tricloro(dioxietileno-O-O')-telurato – mais conhecido como AS101 – têm sido estudados sob o ponto de vista de efeitos biológicos⁴³. Dentre estes, o mais estudado é o AS101, que vem apresentando uma miríade de efeitos biológicos, como efeito radioprotetor⁴⁴, quimioprotetor^{45,46}, prevenção e tratamento de alopecia⁴⁷, como potente imunomodulador^{48,49,50}, além de promover a debilitação de células tumorais, que os tornam um interessante objeto de estudo no tratamento de câncer (revisado em Sredni⁵¹).

Já o desenvolvimento de compostos orgânicos de telúrio está em expansão, compreendendo diferentes arranjos moleculares que, por consequência, apresentam diferentes características e efeitos biológicos. Um dos compostos orgânicos de telúrio mais estudados é o difenil ditelureto (DPDT – *Diphenyl ditelluride*), uma das moléculas orgânicas mais simples de telúrio, usada como intermediário na síntese orgânica⁵².

Há estudos que comparam diretamente os efeitos do composto orgânico DPDT e do composto inorgânico TeCl_4 *in vivo* em astrócitos de ratos⁵³ e em células em cultura⁵⁴, entretanto as respostas foram muito incongruentes, com o TeCl_4 induzindo apoptose e o DPDT supostamente induzindo oncoses nos astrócitos enquanto nas linhagens celulares foi o DPDT que induziu apoptose e o TeCl_4 induziu necrose. Entretanto, estes resultados somente reforçam a ideia de que os compostos de telúrio (tanto orgânicos quanto inorgânicos) têm efeitos sobre a biologia celular de eucariotos, sendo necessários estudos mais aprofundados para esclarecer os mecanismos de citotoxicidade e indução de morte celular. Por enquanto,

acredita-se que a citotoxicidade de telúrio é consequência de sua alta capacidade redox, que reage com grupos tiol de diferentes proteínas fundamentais para os processos celulares tanto de células não tumorais quanto para células do câncer⁵⁵. Entretanto, tem-se verificado para estes compostos uma seletividade em direção a células tumorais, que parece estar relacionada a uma sobrecarga de estresse oxidativo em células tumorais que não é encontrado em células normais⁵⁶.

O alto índice de mortes por melanoma metastático, causado pela dificuldade de ressecção do tumor, aliado à alta resistência às terapias anticâncer utilizadas até o presente, o tornam um importante objeto de estudo. Apesar dos avanços no campo da medicina personalizada, que faz uso do perfil genético de cada tumor para o uso de drogas inibidoras de vias de sinalização (individualmente ou em associação), e imunoterapias, que atuam liberando células imunes de um bloqueio promovido pelo tumor, ainda é interessante o estudo para o desenvolvimento e aplicação de drogas que possam promover um aumento na efetividade de resposta frente o tratamento e também que ultrapassem as limitações mais graves no melanoma metastático – resistência e recidiva.

Sob esse prisma, o presente trabalho pretende contribuir para a descoberta e estabelecimento de novas abordagens no tratamento de melanoma metastático. Para isso, avaliamos os efeitos de dois compostos orgânicos enantioméricos de telúrio sobre a biologia celular de linhagens de melanoma metastático. Embora ambos os compostos sejam formados pelo mesmo número de átomos de cada elemento, o arranjo tridimensional em torno de seu carbono quiral pode lhes conferir características peculiares um em relação a outro. Estudos preliminares mostraram diferentes efeitos, com maior ou menor agressividade nas alterações de morfologia celular das linhagens, de acordo com o enantiômero.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi avaliar os possíveis efeitos dos compostos enantioméricos de telúrio RF-13R e RF-13S sobre a biologia celular de melanomas, focando alterações morfológicas, proliferativas e de capacidade de migração.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a capacidade de lise de membrana dos compostos RF-13R e RF-13S.
- 2) Determinar a concentração inibitória IC_{50} dos compostos FR-13R e RF-13S nas diferentes linhagens celulares utilizadas;
- 3) Avaliar os efeitos dos compostos sobre a morfologia das células e arranjo do citoesqueleto;
- 4) Analisar os processos morfológicos em tempo real por microscopia em tempo real;
- 5) Avaliar alterações de ciclo celular e indução de apoptose;
- 6) Avaliar a capacidade de migração de células tratadas e controle através de ensaio de fechamento de ferida (*wound healing assay*) e migração em câmara de Boyden;
- 7) Avaliar os parâmetros direcionalidade e velocidade de células tratadas com os enantiômeros;
- 8) Determinar o potencial genotóxico dos compostos em algumas linhagens celulares.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMPOSTOS DE TELÚRIO

As organoteluranas enantioméricas (figura 1) RF-13R (1-[butil(dicloro)- λ^4 -telanil]-2-[1R-metoxietil]benzeno) e RF-13S (1-[butil(dicloro)- λ^4 -telanil]-2-[1S-metoxietil]benzeno) foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Rodrigo L.O.R. Cunha, do Centro de Ciências Naturais e Humanas da UFABC (Compostos 3 e 2, respectivamente, no estudo publicado por Piovan et al.⁵⁷). As amostras de ambos compostos foram fornecidas à concentração de 100 mM em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). As concentrações de uso neste trabalho variaram entre 50 nM e 20 μ M – o que garantiu uma concentração não-tóxica de DMSO durante o tratamento das células – e foram diluídas em meio de cultura somente no momento de uso.

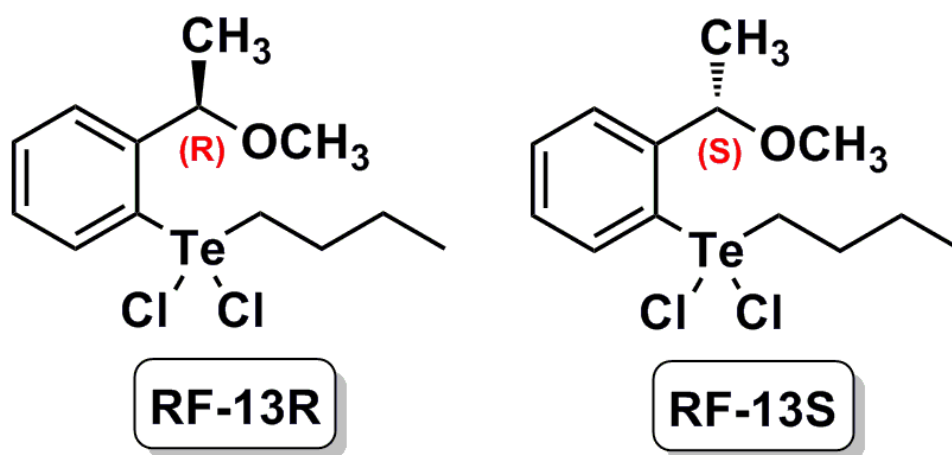


Figura 1 – Fórmula estrutural dos enantiômeros RF-13R e RF-13S, sintetizados pelo Dr. Rodrigo Cunha do Centro de Ciências Naturais e Humanas da UFABC.

3.2 LINHAGENS CELULARES

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens de melanoma metastático humano HT-144, SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-147 e uma linhagem de *nevus* NGM (usada como controle não-tumoral). As linhagens HT-144 e NGM foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro, e as linhagens SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-147 foram gentilmente cedidas pela Prof. María S. Soengas, do *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas* (Madri, Espanha), através da Prof. Silvy Stuchi Maria Engler, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Este

painel de linhagens celulares de melanoma foi utilizado devido à diferença no perfil de mutações genéticas, listadas na tabela 1, que as tornam diferencialmente resistentes a quimioterapia convencional.

Tabela 1 – Listagem de mutações nos genes mais incidentes em melanomas nas diferentes linhagens

Linhagem\Gene	BRAF	PTEN	ATM	NRAS	p53
HT144	V600E ¹	wt ¹	W2845 ¹	wt ¹	wt ¹
NGM	*	*	*	*	*
SK-Mel-19	V600E ¹	ND	ND	wt ¹	wt ¹
SK-Mel-28	V600E ¹	T167A ¹	ND	wt ¹	L145R ¹ /R273H ²
SK-Mel-147	wt ²	ND	ND	Q61R ²	wt ²

¹: canSAR ICR UK; ²: Brohem et al.⁵⁸.
ND: Não Disponível nos bancos de dados avaliados; wt: wild type.

Todas as linhagens foram cultivadas em meio de cultura DMEM/Ham-F12 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB – Vitrocell Embriolife, Campinas, São Paulo, Brasil) e os tratamentos foram realizados em meio de cultura DMEM/Ham-F12 suplementado com 1% de SFB, exceto quando apontado na descrição do experimento, sob condições de 37 °C de temperatura e atmosfera de 5% de CO₂. Estoques de células obtidos em diferentes períodos foram mantidos em nitrogênio líquido. Abaixo, na figura 2, podemos verificar a morfologia típica de cada linhagem sob aumento de 20 X (Figuras B-F), e sob aumento de 10 X para a linhagem NGM (Figura 2A) – devido à sua grande área de superfície. Todas as imagens foram obtidas em microscópio invertido de contraste de fase AMG Evos XL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

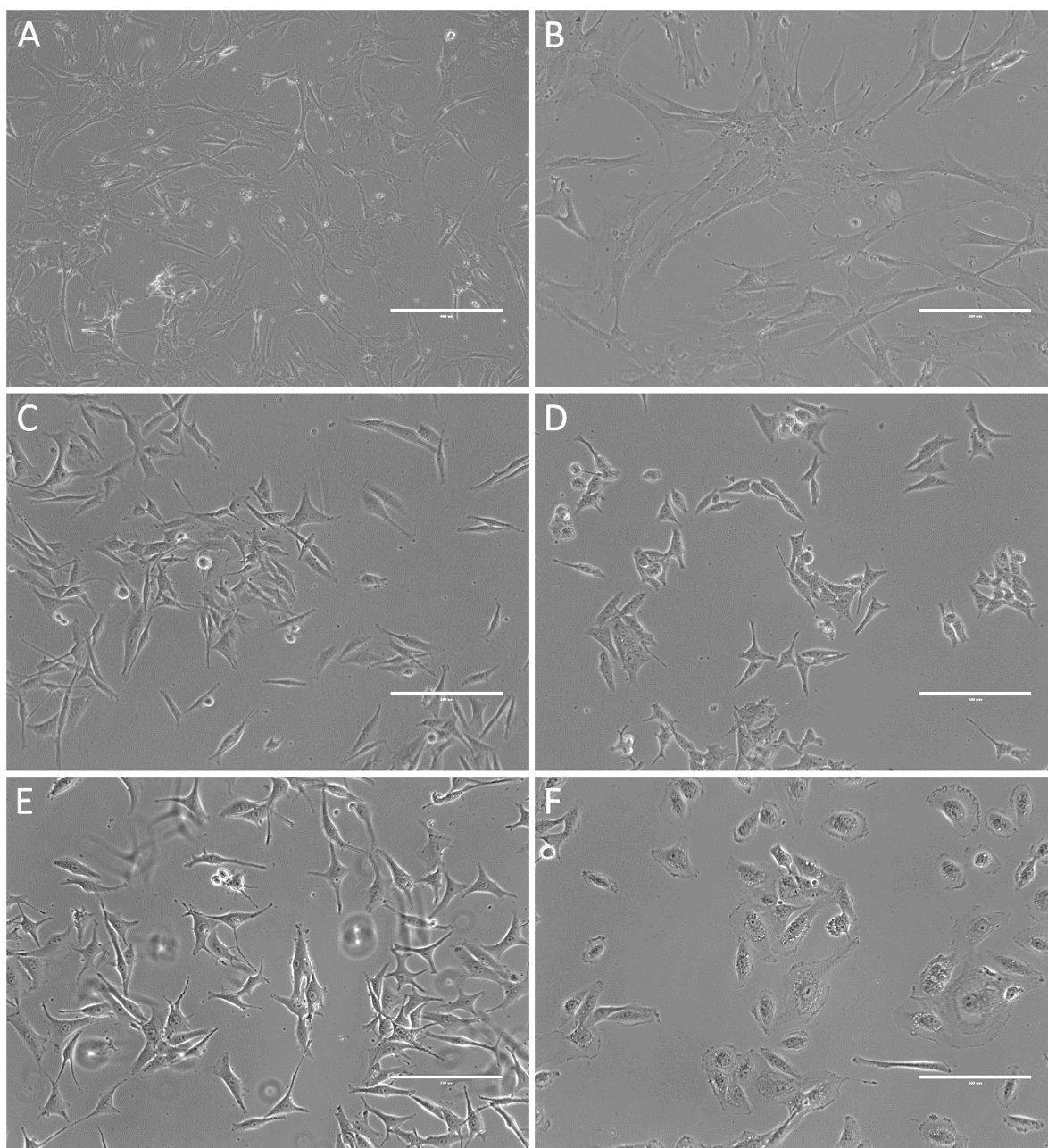


Figura 2 – Fotomicrografia das linhagens celulares utilizadas neste trabalho. A: NGM em aumento de 10 X – Barra corresponde a 400 µm; B-F: Imagens em aumento de 20 X – Barra corresponde a 200 µm; B: NGM – Notar que a área de superfície celular desta linhagem é muito superior à área das linhagens tumorais; C: HT-144; D: SK-Mel-19; E: SK-Mel-28; F: SK-Mel-147.

3.3 ENSAIO DE HEMÓLISE

O ensaio de hemólise foi realizado de acordo com Rangel et al.⁵⁹. Foi coletado o sangue de camundongos Swiss machos entre 25-30 g de massa total (Biotério Central do Instituto Butantan, protocolo do comitê de ética 459/08), e as hemácias foram lavadas e isoladas de elementos plasmáticos através de diluições em solução salina. O sangue total (em EDTA) foi

colocado em um béquer com um volume aproximadamente 30 vezes maior de solução salina de Krebs-Henseleit (113 mM NaCl; 1,2 mM KH_2PO_4 ; 4 mM KCl; 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,5 mM CaCl_2 ; 25 mM NaHCO_3 ; 11,1 mM $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e mantido sob agitação constante por 15 minutos. A mistura foi centrifugada 3 vezes a 3000 rpm por 5 minutos para remoção dos componentes plasmáticos, após o qual foi preparada uma suspensão de eritrócitos (SE) a 4% (v/v) em solução fisiológica de Krebs-Henseleit.

As organoteluranas foram diluídas em solução fisiológica de Krebs-Henseleit, e posteriormente colocadas em uma placa de ELISA transparente de fundo chato de 96 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça), adicionando-se o mesmo volume de SE 4%. Como controle negativo, foi usado somente solução fisiológica e como controle positivo, 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) – que foi considerado indutor de 100% de hemólise. Após uma hora de incubação a temperatura ambiente sob agitação constante, o material foi submetido a centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para uma nova placa de ELISA e a atividade hemolítica foi medida através da absorbância do sobrenadante a 540 nm.

3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE POR MTS – IC_{50}

O ensaio de viabilidade por MTS (CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay – Promega, Fitchburg, Winsconsin, EUA) foi usado para determinar o IC_{50} (metade da concentração inibitória máxima) dos compostos sobre as linhagens celulares a serem estudadas. Para isso, as células tumorais foram plaqueadas a uma densidade inicial de 5×10^3 células por poço em placa de 96 poços (TPP) – a linhagem NGM foi plaqueada a uma densidade inicial de 1×10^4 células por poço – e, após 24 horas, foram adicionadas concentrações crescentes dos compostos RF-13R e RF-13S em escala logarítmica (0,1 μM , 0,316 μM , 1 μM , 3,16 μM , 10 μM , 31,6 μM , 100 μM , 316 μM , 1000 μM). As células foram expostas aos compostos pelo período de 24 horas e, após esse tempo, foram adicionados 20 μL de MTS e o material foi incubado por 3 horas. Neste ínterim, as mitocôndrias viáveis das células processam o composto MTS, gerando um produto solúvel de coloração roxa, cuja concentração é medida a partir da absorbância da amostra em 590 nm. Com isso, pode-se determinar, indiretamente, a viabilidade da amostra. As absorbâncias são plotadas em um

gráfico e é estabelecida uma curva concentração-resposta sobre a qual interpola-se o ponto de 50 % de viabilidade. Foi considerado como branco o sobrenadante (meio de cultura sem células) com a adição do sal de MTS. Como controle negativo foram adicionados 20 µL de água destilada 15 minutos antes da adição do sal de MTS para inviabilizar as células; e como controle positivo, foram usadas células sem adição dos enantiômeros. Os dados foram analisados em *software* GraFit⁶⁰.

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para verificar a morfologia das células, realizamos o experimento de imunofluorescência. As células foram plaqueadas a uma densidade inicial de $1,33 \times 10^5$ células por placa de 35 mm (TPP) com lamínula 18 x 18 mm ou 20 x 20 mm e mantidas por 24 horas. Então, foi realizada a exposição aos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM por 24 horas. Após esse período, as células foram fixadas com 3,7% formaldeído (Sigma-Aldrich) por 15 minutos, permeabilizadas com 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) por 10 minutos e procedeu-se a incubação com os marcadores. O citoesqueleto de tubulina foi marcado com anticorpo primário mouse anti- $\alpha\beta$ -tubulina (Sigma-Aldrich) *overnight* a 4 °C e secundário anti-mouse-Cy5 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) por 2 horas a temperatura ambiente; então, o citoesqueleto de actina foi marcado com 20 µM faloidina-FITC (Sigma-Aldrich) por 40 minutos e a lâmina foi fechada com 20 µM DAPI (Sigma-Aldrich) e solução anti-*fading* *VectaShield* (Vector Laboratories, Burlingame, California, EUA). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal de varredura a laser LSM 780-NLO (Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha).

3.6 ANÁLISE DE CIRCULARIDADE

As células foram plaqueadas com densidade inicial de $1,33 \times 10^5$ células por placa de 35 mm (TPP) em 2 mL de meio de cultura DMEM/Ham-F12 suplementado com 10% de SFB e incubadas por 24 horas. Após esse período, as células foram expostas aos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM por 24 horas. Então, todas as células foram coletadas: o sobrenadante foi coletado em tubo de fundo cônico de 15 mL (Sarstedt,

Westphalia, Nümbrecht, Alemanha), as placas foram lavadas com PBS e o lavado também foi coletado no mesmo tubo, e as células foram trispinizadas (tripsina 0,05% EDTA 0,02%) e coletadas; mais uma vez a placa foi lavada para recuperar células que ainda restassem na placa e o lavado foi coletado no tubo. A suspensão de células foi então centrifugada a 1000 g por 7 minutos e o *pellet* foi ressuspenso vigorosamente em 1 mL de PBS e foram adicionados 3 mL de metanol (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha) gelado por, no mínimo, 3 horas antes de proceder com a coloração de DNA. No momento da análise, as células foram centrifugadas a 1000 g por 7 minutos e lavadas em PBS duas vezes; então, do *pellet* de células, foram coletadas 1×10^5 células, que foram incubadas com RNaseA (Sigma-Aldrich) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em gelo por 1 hora e o experimento foi adquirido e analisado em citômetro de fluxo Amnis ImageStream Mark II System (Millipore).

3.7 MORFOLOGIA POR MICROSCOPIA EM TEMPO REAL

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo transparente chato (TPP) à densidade de 1×10^3 células por poço e mantidas a 37 °C com atmosfera de 5% CO_2 por 24 horas. Após esse período, as células foram expostas aos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μM e 20 μM por 65 horas. Foram adquiridas imagens de 3 campos por poço, com intervalo de 30 minutos, no equipamento IN Cell Analyser 2200 (GE, Chicago, Illinois, EUA). Como controle, foi utilizado somente meio DMEM/Ham-F12 suplementado com 1% SFB. O experimento foi realizado em quadruplicata e as imagens mostradas são representativas dos eventos ocorridos em cada tratamento.

3.8 CICLO CELULAR

Para a determinação de ciclo celular, as células foram plaqueadas com densidade inicial de $1,33 \times 10^5$ células por placa de 35 mm (TPP) em 2 mL de meio de cultura DMEM/Ham-F12 suplementado com 10% de SFB e incubadas por 24 horas. Após esse período, as células foram expostas aos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μM e 20 μM por 24 horas. Então, todas as células foram coletadas: o sobrenadante foi coletado em tubo de fundo cônico de 15 mL (Sarstedt, Westphalia, Nümbrecht, Alemanha), as placas foram lavadas com PBS e

o lavado também foi coletado no mesmo tubo. As células foram trispinizadas (tripsina 0,05%, EDTA 0,02%) e coletadas; mais uma vez a placa foi lavada para recuperar células que persistissem na placa e o lavado foi coletado no tubo. A suspensão de células foi então centrifugada a 1000 g por 7 minutos, o *pellet* foi ressuscitado vigorosamente em 1 mL de PBS e foram adicionados 3 mL de metanol gelado (Merck) por, no mínimo, 3 horas antes de proceder com a coloração de DNA. No momento da análise, as células foram centrifugadas a 1000 g por 7 minutos e lavadas em PBS duas vezes; então o *pellet* de células foi incubado com RNaseA 10 µg/mL (Sigma-Aldrich) e iodeto de propídio 10 µg/mL (Sigma-Aldrich) em gelo por 1 hora e imediatamente analisado em citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA).

3.9 MORTE CELULAR

Para o ensaio de morte celular, foi usado o Guava® Caspase Kit para caspase 9 (Millipore). As células foram plaqueadas à densidade de $1,33 \times 10^5$ células por placa de 35 mm (TPP) e tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S em diferentes concentrações por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e imediatamente contadas. Usamos somente 5×10^4 células por amostra, que foram separadas em um volume de 100 µL de PBS em um minitubo de 1,5 mL. Então, foram adicionados 10 µL de 10 X *caspase reagent working solution*. As amostras foram vigorosamente homogeneizadas e incubadas no escuro a 37 °C com atmosfera de 5% CO₂. Após a incubação, foram adicionados 100 µL de 1 X *apoptosis wash buffer* e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 300 g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 200 µL de 1 X *apoptosis wash buffer* para ressuscitar as células. Mais uma vez as amostras foram centrifugadas e ressuscitadas no tampão. Finalmente, foram adicionados 200 µL de 7-AAD *reagent working solution* e as amostras foram vigorosamente homogeneizadas e incubadas no escuro por 10 minutos. Imediatamente após a incubação, procedemos a aquisição e análise no equipamento Guava EasyCyte Mini (Millipore).

3.10 ENSAIO DE MIGRAÇÃO – FECHAMENTO DE FERIDA

As células foram plaqueadas à densidade de 1×10^4 células por poço em placa de 96 poços de fundo chato (TPP) e mantidas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas até atingir a confluência. Uma vez confluentes, foi realizada uma pequena marca no fundo do poço com o WoundMaker™, um aparato que gera feridas homogêneas com diâmetro de 700-800 µm nas monocamadas em placas de 96 poços. Então, após o preparo das feridas, as células foram expostas aos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM por 62 horas, com aquisição de imagens a cada 1 hora em equipamento de microscopia de contraste de fase (IncuCyte Zoom – Essen Bioscience, Ann Arbor, Michigan, EUA) mantido em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O experimento foi realizado em quadruplicata e a análise do fechamento da área da ferida foi realizado com o *software* do próprio aparelho.

3.11 ENSAIO DE MIGRAÇÃO / CELL TRACKING POR MICROSCOPIA EM TEMPO REAL

Foram plaqueadas 300 células por poço em uma placa de 96 poços de fundo chato (TPP) e mantidas a 37 °C por 24 horas. Então, as células foram expostas aos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM por 24 horas. Foram adquiridas imagens de 3 campos por poço com intervalo de 15 minutos no equipamento IN Cell Analyser 2200 (GE). Como controle foi utilizado somente meio DMEM 1 % SFB. Para as análises de *cell tracking*, foram analisadas, em média, 5 células por campo, com a condição de a célula apresentar movimentação (mesmo que discreta) e não entrar em contato físico com as células vizinhas – caso isso ocorresse, o *tracking* só ocorreria até o momento prévio ao contato. O mesmo se aplica para os eventos de perda completa de adesão e/ou mitoses. O experimento foi realizado em quadruplicata e as análises de velocidade de migração e direcionalidade foram realizadas com o *plugin Manual Tracking* do *software* ImageJ⁶¹. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism 5 usando *two-way* ANOVA com pós-teste de Tucker⁶².

3.12 ENSAIO DE MIGRAÇÃO – TRANSWELL

As células foram plaqueadas à densidade de 2×10^4 células por poço em insertos de policarbonato (diâmetro da membrana 6,5 mm e poros de 8,0 μm – Corning, Corning, New York, EUA) em meio DMEM/Ham-F12 suplementado com 1% SFB contendo os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μM e 20 μM . Após 30 minutos, foram colocados 600 μL de meio DMEM/Ham-F12 suplementado com 10% SFB na câmara inferior do sistema e a placa foi incubada a 37 °C por 4 horas. Após esse período, as células que não haviam migrado completamente para a face inferior da membrana foram removidas com um *swab* de algodão e as membranas foram fixadas com etanol 70% (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha) por 10 minutos e depois deixadas para secar por 10 minutos. As células foram coradas com cristal violeta (0,2% em 2% etanol) por 10 minutos e o excesso de corante foi removido com sucessivas lavagens em água destilada. A membrana secou naturalmente e foi removida do suporte com um bisturi e montada entre lâmina e lamínula com fita adesiva. As membranas foram analisadas em microscópio invertido de contraste de fase AMG Evos XL (Thermo Fisher Scientific) e foram contadas todas as células que haviam atravessado para a face inferior da membrana. Como controle positivo, foi usado somente meio DMEM/Ham-F12 suplementado com 1% de SFB (sem droga) no suporte e meio DMEM/Ham-F12 suplementado com 10% de SFB na câmara inferior; e como controle negativo, foi usado DMEM/Ham-F12 suplementado com 1% de SFB tanto no suporte quanto na câmara inferior. O experimento foi realizado em triplicata.

3.13 ENSAIO DE MICRONÚCLEO COM BLOQUEIO DE CITOCINESE (CBMN)

As células foram cultivadas em placas de 35 mm com lamínula, com densidade inicial de 5×10^4 células por placa. Após 48 horas do plaqueamento, as células foram expostas aos compostos de telúrio RF-13R e RF-13S nas concentrações de 50 nM e 100 nM. Os experimentos CBMN (*Cytokinesis-block micronucleus assay*) foram realizados usando como controle negativo a ausência de tratamento e como controle positivo o tratamento com doxorrubicina (Sigma-Aldrich) a 1 μM (concentração definida a partir dos resultados de Dolfini et al.⁶³), sendo que todos os tratamentos foram realizados na presença do inibidor de citocinese citocalasina B 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma-Aldrich). Após o tratamento por 24 horas, as células

foram fixadas com 3,7% formaldeído (Sigma-Aldrich) por 10 minutos, permeabilizadas por 10 minutos com 0,5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e incubadas com RNase A (Sigma-Aldrich) 10 µg/mL. As lâminas foram montadas com Vecta-Shield (Vector Laboratories) e iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) 10 µg/mL e analisadas em microscópio de fluorescência Optiphot2 (Nikon, Tokyo, Kantō, Japão) e então foi determinada a frequência das seguintes alterações nucleares: micronúcleo, broto nuclear e ponte nucleoplásmica, em 1000 células binucleadas – baseando-se nos critérios propostos por Fenech et al.⁶⁴. A análise estatística foi realizada no *software* GraphPad Prism 5 usando *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni⁶².

4 RESULTADOS

4.1 ENSAIOS PRÉ-ANALÍTICOS

Antes de iniciar os testes com os compostos de telúrio em linhagens celulares, era necessário determinar sua capacidade hemolítica, para verificar se os compostos não causariam lise celular inespecífica. Caso o composto apresentasse atividade hemolítica em baixas concentrações, seu uso em culturas celulares seria inviabilizado e, havendo interesse de sua aplicação em sistemas biológicos ou testes em animais, seria necessário um minucioso estudo para o desenvolvimento um sistema de entrega do composto somente na região (tecido ou órgão) de interesse. Entretanto, o teste mostrou atividade hemolítica somente a partir de concentrações próximas de 316 μM ($\text{Log}[-3,5 \text{ M}]$), tanto para o composto RF-13R quanto para o composto RF-13S (Figura 3), o que permite trabalhar com concentrações até 100 μM sem induzir lise celular inespecífica.

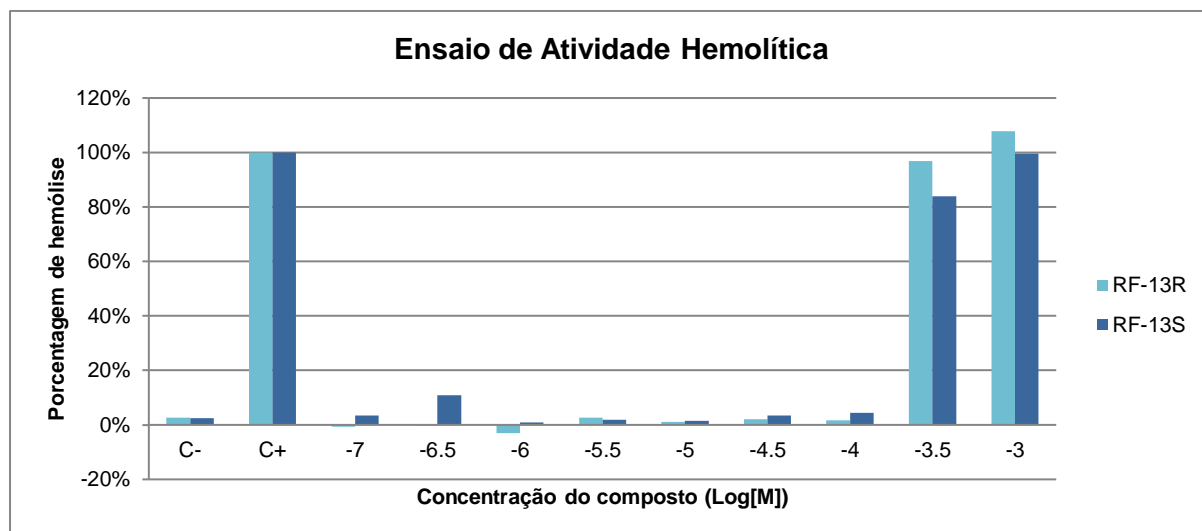


Figura 3 – Ensaio de atividade hemolítica para os compostos RF-13R e RF-13S.

Após determinar a faixa de segurança para o uso dos enantiômeros em sistemas biológicos através do ensaio de atividade hemolítica, foi necessário estabelecer as concentrações de tratamento com os compostos para as linhagens utilizadas no estudo. Para isto, realizamos o ensaio de viabilidade por MTS (Promega), que avalia a viabilidade celular através do comprometimento das funções enzimáticas mitocondriais. Usando uma faixa de concentrações dos compostos RF-13R e RF-13S entre 100 nM e 1,0 mM (10000 vezes de diferença entre a concentração mais baixa e a mais alta), foi possível determinar a metade da concentração inibitória máxima (*half maximal inhibitory concentration*), conhecida como IC_{50} , para cada linhagem tumoral. Como pode ser visto na figura 4, não foi possível determinar a

concentração inibitória dos compostos RF-13R e RF-13S para a linhagem não-tumoral NGM dentro da faixa de concentrações usadas (entre 100 nM e 1,0 mM), sendo que o *software* Grafit estabeleceu que o IC₅₀ está acima da concentração de 30 µM. Já entre as linhagens de melanoma metastático, as linhagens HT-144, SK-Mel-19 e SK-Mel-147 apresentaram curvas de resposta similares, em que ambos os compostos apresentaram concentração de IC₅₀ em torno de 18 µM (entre 15,3 µM e 20,2 µM), enquanto a linhagem SK-Mel-28 apresentou maior sensibilidade aos compostos, com IC₅₀ de aproximadamente 9 µM (entre 8,1 µM e 9,5 µM) também para ambos os compostos. Os valores de IC₅₀ dos compostos RF-13R e RF-13S para as linhagens de melanoma metastático estão listados na tabela 2. Os resultados mostram uma seletividade inespecífica dos enantiômeros para linhagens celulares tumorais, não afetando as funções celulares da linhagem controle não-tumoral NGM.

Tabela 2 – IC₅₀ dos compostos RF-13R e RF-13S para as linhagens celulares após tratamento pelo período de 24 horas. A linhagem não-tumoral NGM não apresentou alteração em sua viabilidade, o que impossibilitou a determinação de seu IC₅₀.

Linhagem	RF-13R	RF-13S
NGM	>30 µM	>30 µM
HT-144	18,1±5,3 µM	15,26±3,0 µM
SK-Mel-19	18,07±3,1 µM	19,18±3,9 µM
SK-Mel-28	9,52±0,3 µM	8,09±0,5 µM
SK-Mel-147	18,57±2,5 µM	20,19±2,4 µM

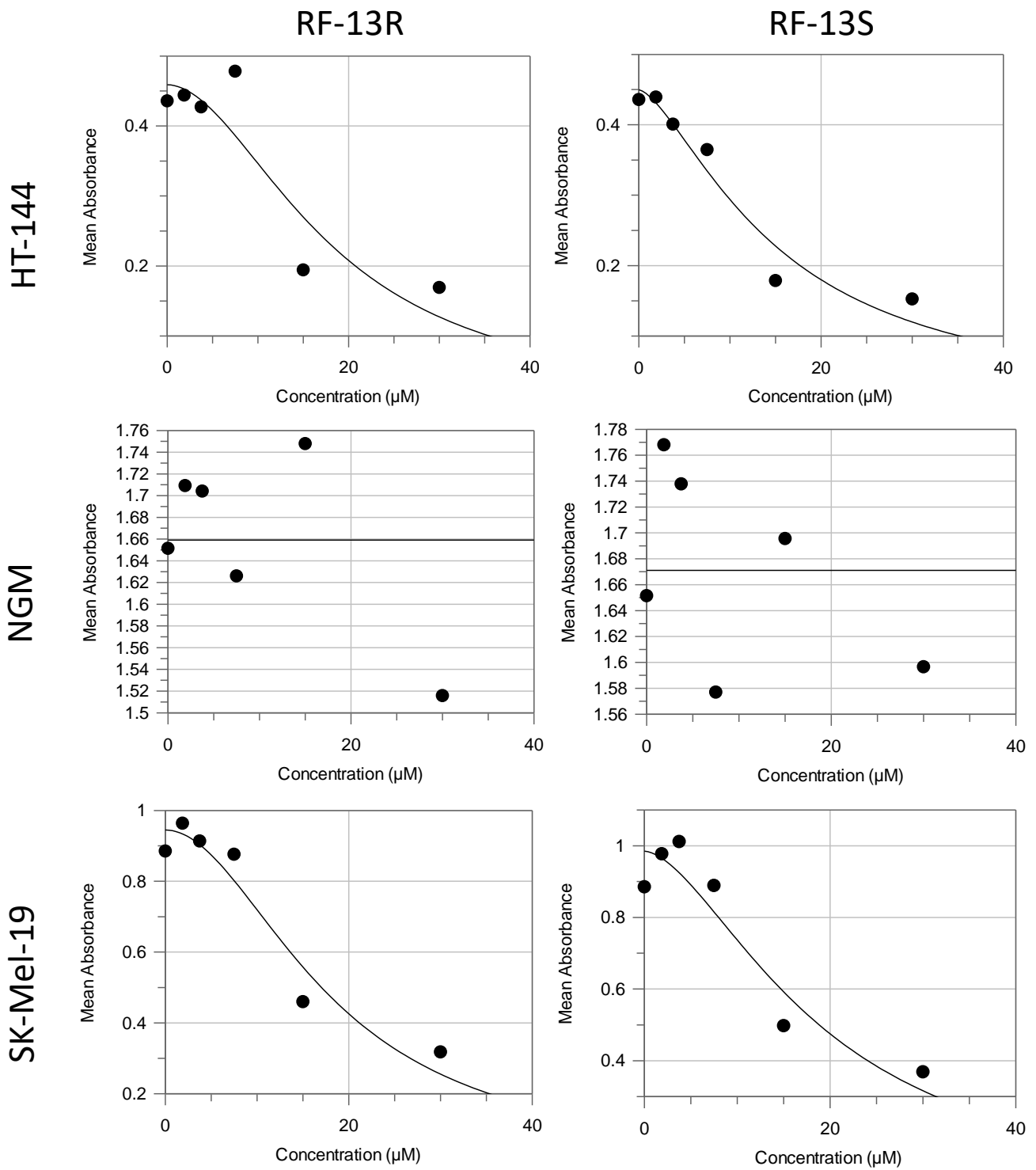


Figura 4 – Determinação da concentração inibitória IC_{50} dos compostos RF-13R e RF-13S sobre as diferentes linhagens celulares analisadas (continua)

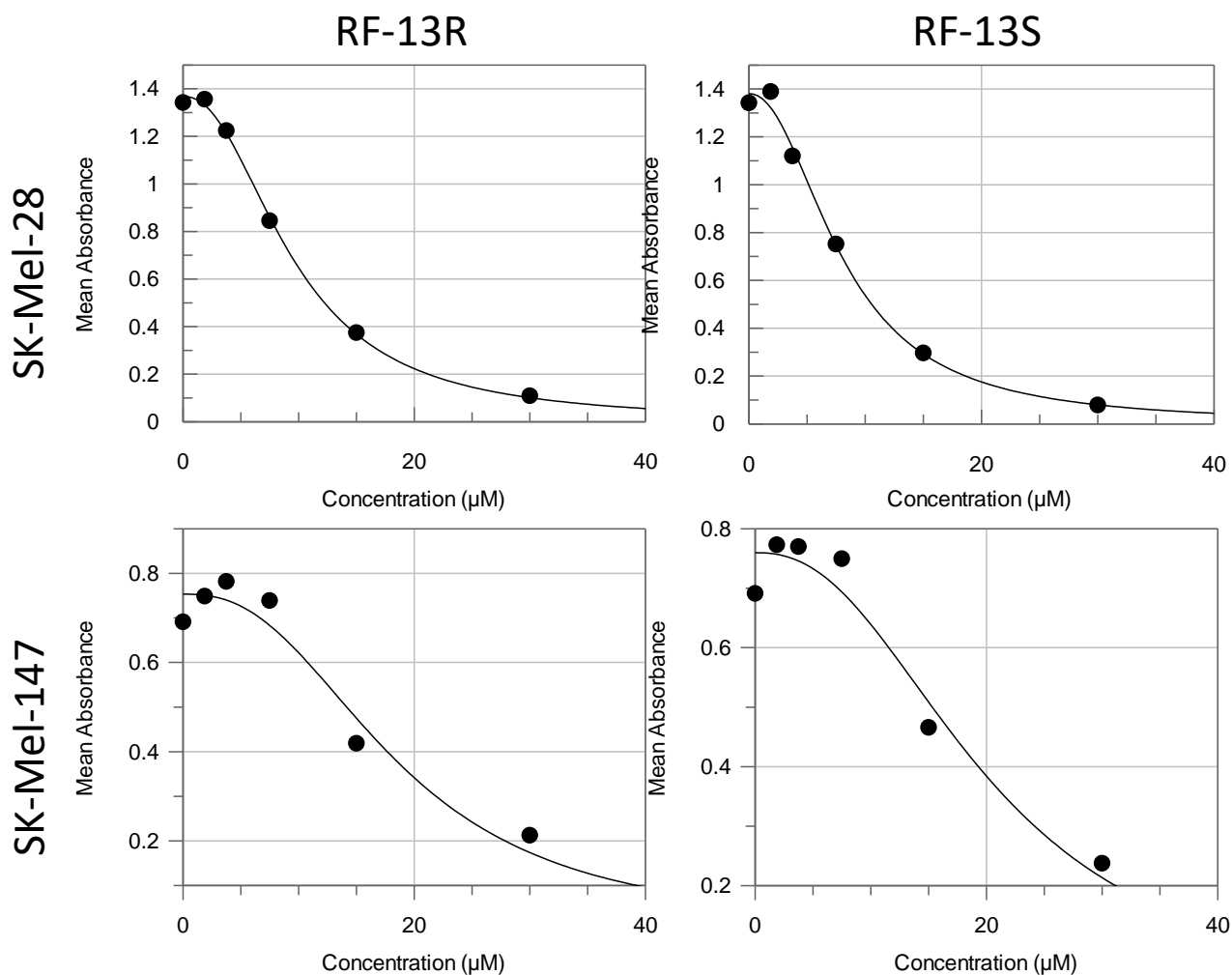


Figura 4 – Determinação da concentração inibitória IC_{50} dos compostos RF-13R e RF-13S sobre as diferentes linhagens celulares analisadas (continuação)

4.2 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – IMUNOFLUORESCÊNCIA

Durante os tratamentos das linhagens celulares com os compostos RF-13R e RF-13S, pudemos observar – após 24 horas – ao microscópio de contraste de fase, um grande número de células em suspensão no meio de cultura, e as células que permaneciam aderidas à placa ou à lamínula apresentavam morfologia distinta da encontrada nos controles.

Interessantemente, em concordância com os resultados obtidos no ensaio de viabilidade por MTS, os compostos induziram perturbações de citoesqueleto em todas as linhagens tumorais, porém apresentaram efeitos muito mais brandos na linhagem não-tumoral NGM. Imagens de imunofluorescência da linhagem NGM (Figura 5) tratada com os compostos RF-13R e RF-13S

mostram células mais alongadas que as não tratadas, entretanto elas ainda mantinham a organização do citoesqueleto de tubulina e actina semelhante às células controle, apresentando fibras de estresse mesmo nas concentrações mais altas de tratamento (20 μM). Já as linhagens tumorais HT-144, SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-147 mostravam desarranjo do citoesqueleto, perda da morfologia característica de cada linhagem e perda de volume citoplasmático; além disso, em alguns casos, era evidente também a formação de projeções de membrana (que a partir daqui chamaremos de *blebs*), mesmo nas concentrações mais baixas de tratamento. A presença de *blebs* vem acompanhada de uma extensa perda de volume citoplasmático, como pode ser visto nas células de todas as linhagens que apresentam este fenômeno.

Na linhagem HT-144 (Figura 6), pudemos ver alterações morfológicas e formação de *blebs* de membrana mesmo na concentração de 10 μM para ambos os compostos e observamos uma grande quantidade de células não aderidas à superfície de cultura após o tratamento com a concentração mais alta dos compostos por 24 horas (observado em microscópio invertido – dado não mostrado). Exclusivamente na concentração de 10 μM do composto RF-13R, encontramos uma célula com núcleo fragmentado em corpúsculos, o que parece ser indicativo de apoptose, entretanto esse evento foi pontual e não foi encontrado em outras linhagens.

A linhagem SK-Mel-19 (Figura 7) foi a que apresentou maior sensibilidade ao composto em relação à perda de adesão celular ao substrato. Essa é uma linhagem que já apresenta maior facilidade de soltura do substrato em relação às outras linhagens usadas neste estudo, o que levou a uma perda expressiva de células durante o tratamento e preparo da amostra para imunofluorescência, sendo que a concentração de 20 μM levou à perda de quase todas as células até o fim do preparo do material para a aquisição de imagens.

Nas células controle da linhagem SK-Mel-28 (Figura 8), é possível observar as fibras de estresse e a rede de microtúbulos, enquanto as células tratadas apresentam comprometimento deste arranjo que, embora menos grave que os efeitos encontrados na linhagem SK-Mel-19, ainda são relevantes. Também verificamos o que parece ser uma hiperestabilização do citoesqueleto após tratamento com ambos os compostos na concentração mais baixa (10 μM), pois as células que ainda se mantinham aderidas

apresentavam prolongamentos derivados de comprometimento na soltura da adesão da porção traseira da célula, com marcação intensa de tubulina. Na concentração mais alta de RF-13R e nas duas concentrações de RF-13S, pudemos verificar a formação de *blebs* de membrana e aumento na intensidade de marcação de actina em algumas células.

Finalmente, na linhagem SK-Mel-147 (Figura 9), encontramos um grande número de células com morfologia comprometida e com protrusões de membrana (*blebs*), bem como células com os prolongamentos iguais aos encontrados em células da linhagem SK-Mel-28.

Os resultados encontrados no ensaio de imunofluorescência corroboram os resultados de ensaio de viabilidade, em que os compostos RF-13R e RF-13S parecem apresentar um efeito muito sutil na linhagem não-tumoral NGM, atuando seletivamente contra células tumorais, ainda assim de maneira inespecífica, ou seja, independente do *background* de mutações que cada linhagem apresenta, o que representa uma alternativa muito atraente para o tratamento de melanomas metastáticos. Além disso, o composto RF-13S parece apresentar um maior potencial citotóxico, causando alterações morfológicas na linhagem SK-Mel-28 mesmo na concentração de 10 μ M.

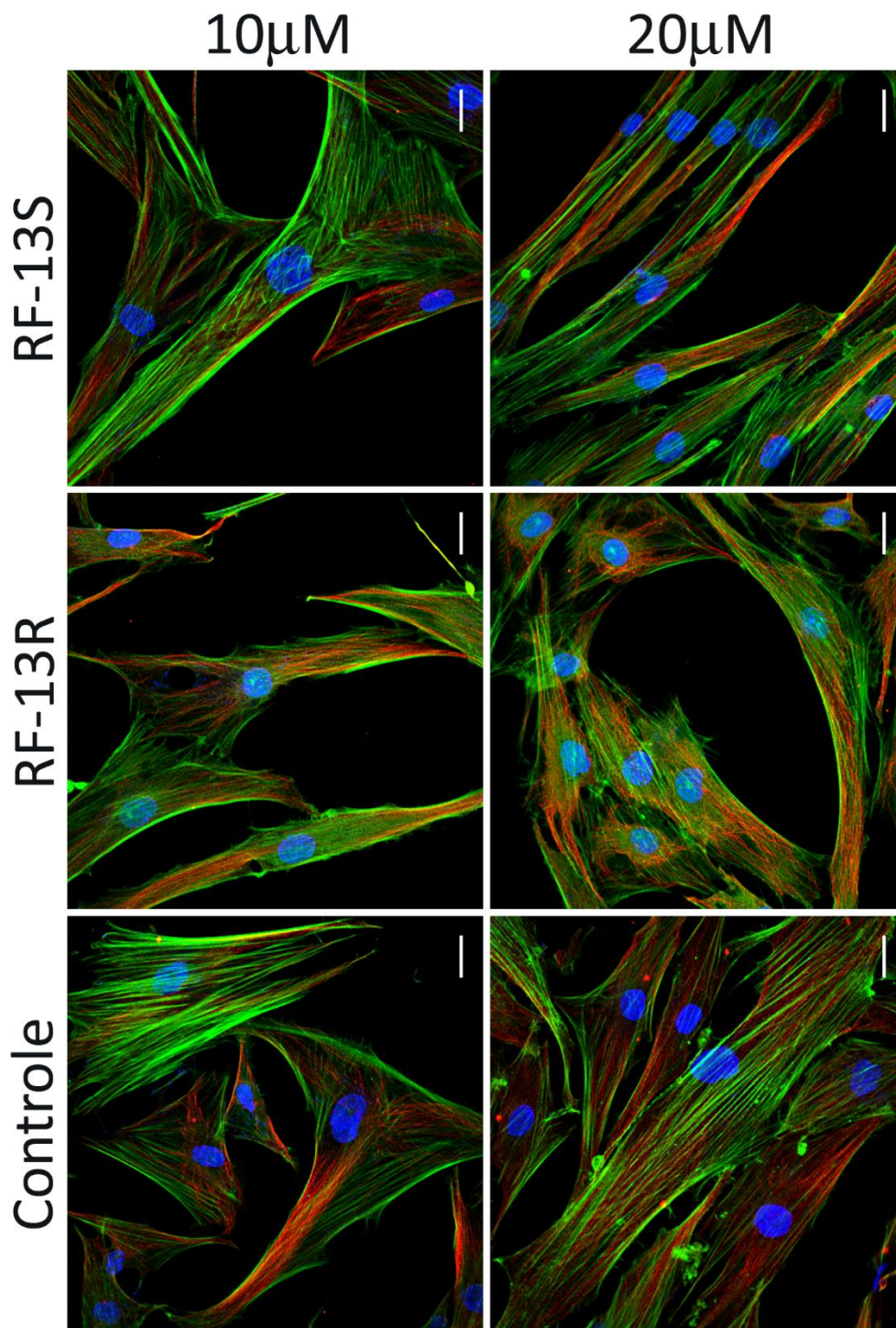


Figura 5 –Imagens de imunofluorescência da linhagem NGM sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. Actina marcada faloidina-FITC (verde), tubulina marcada com anti- $\alpha\beta$ -tubulina (anticorpo secundário mouse-CY5 – vermelho) e núcleos corados com DAPI em azul. Barras correspondem a 20 μ m.

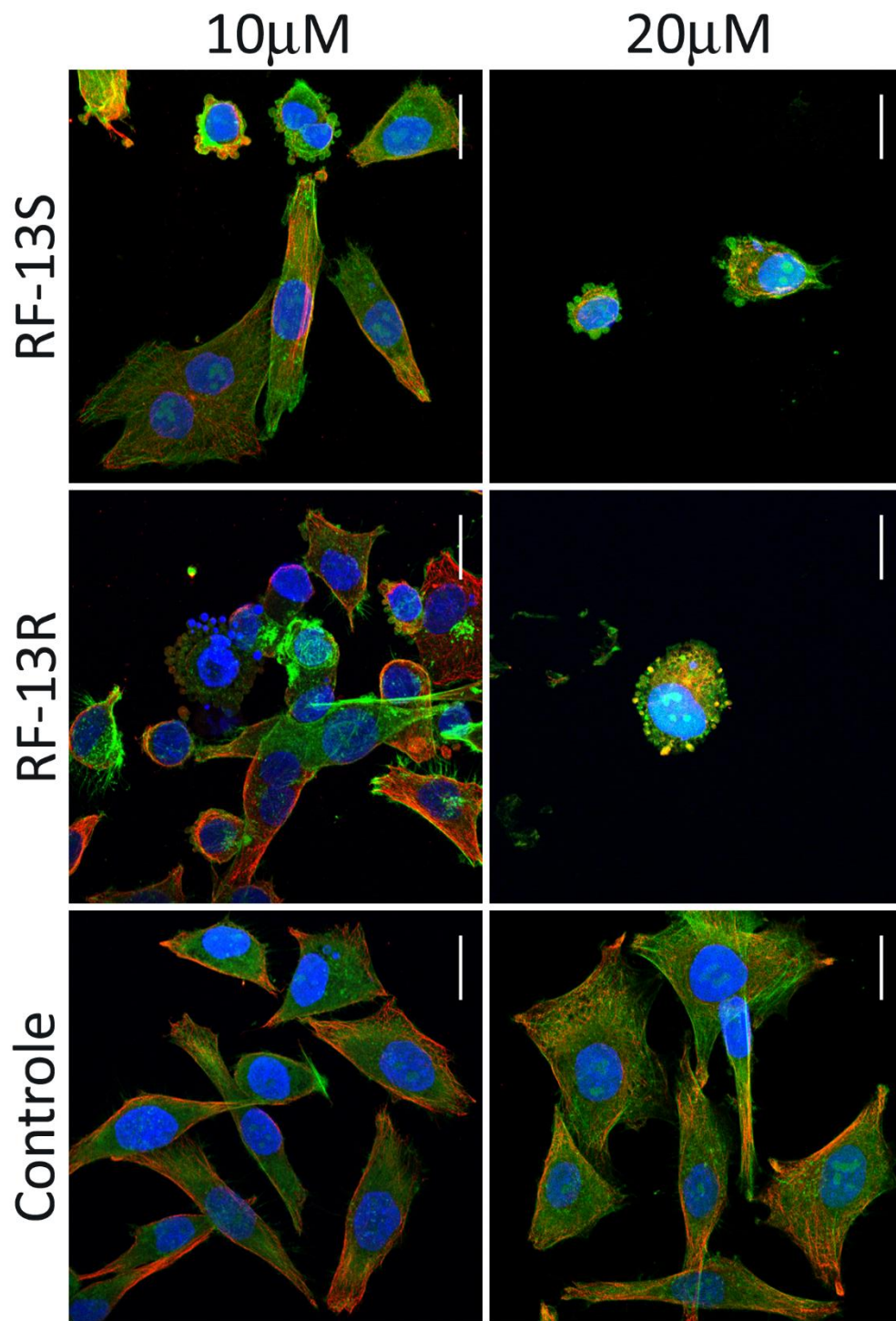


Figura 6 – Imagens de imunofluorescência da linhagem HT-144 sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. Actina marcada faloidina-FITC (verde), tubulina marcada com anti- $\alpha\beta$ -tubulina (anticorpo secundário mouse-CY5 – vermelho) e núcleos corados com DAPI em azul. Barras correspondem a 20 μ m.

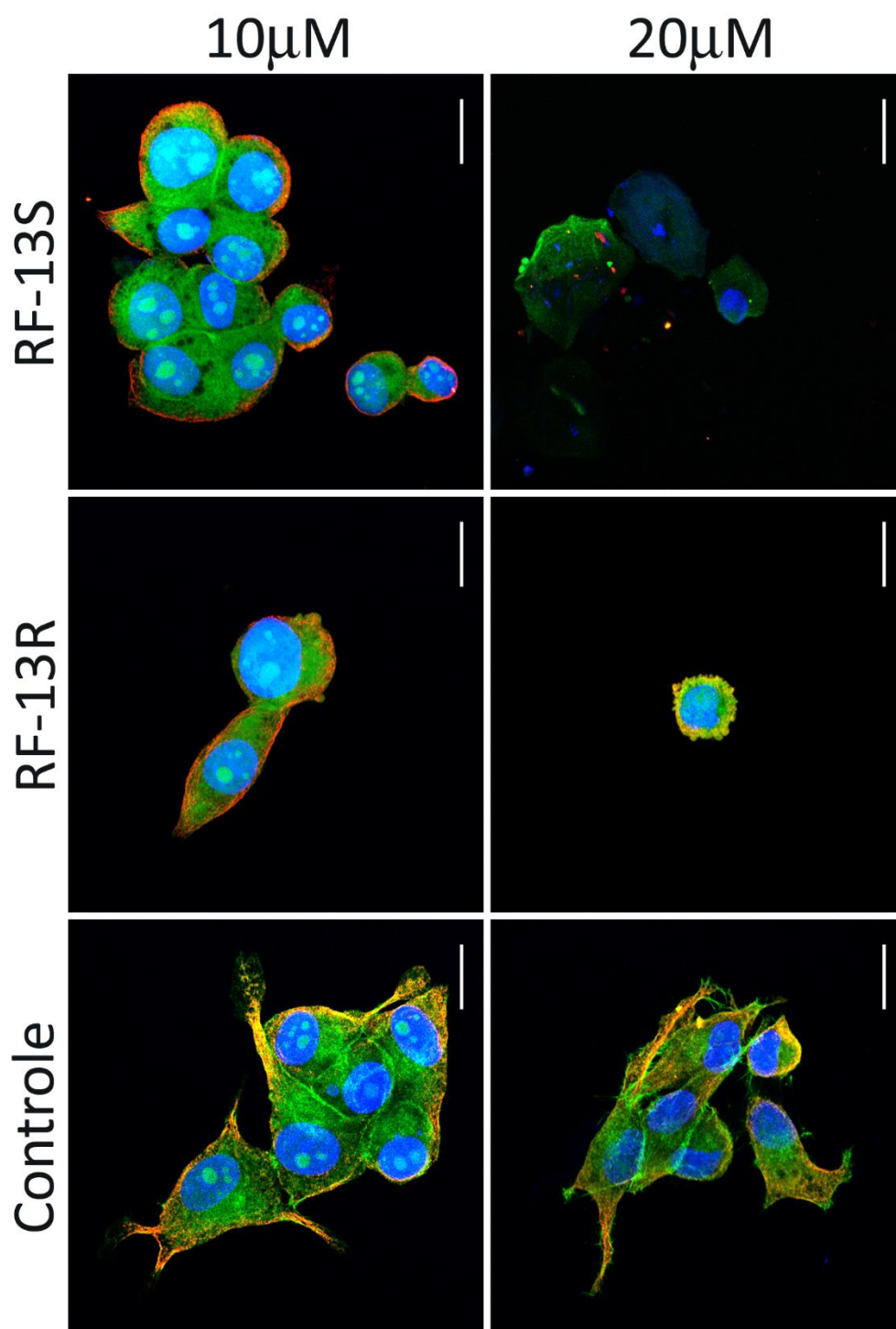


Figura 7 – Imagens de imunofluorescência da linhagem SK-Mel-19 sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. Actina marcada faloidina-FITC (verde), tubulina marcada com anti- α -tubulina (anticorpo secundário mouse-CY5 – vermelho) e núcleos corados com DAPI em azul. Barras correspondem a 20 μ m.

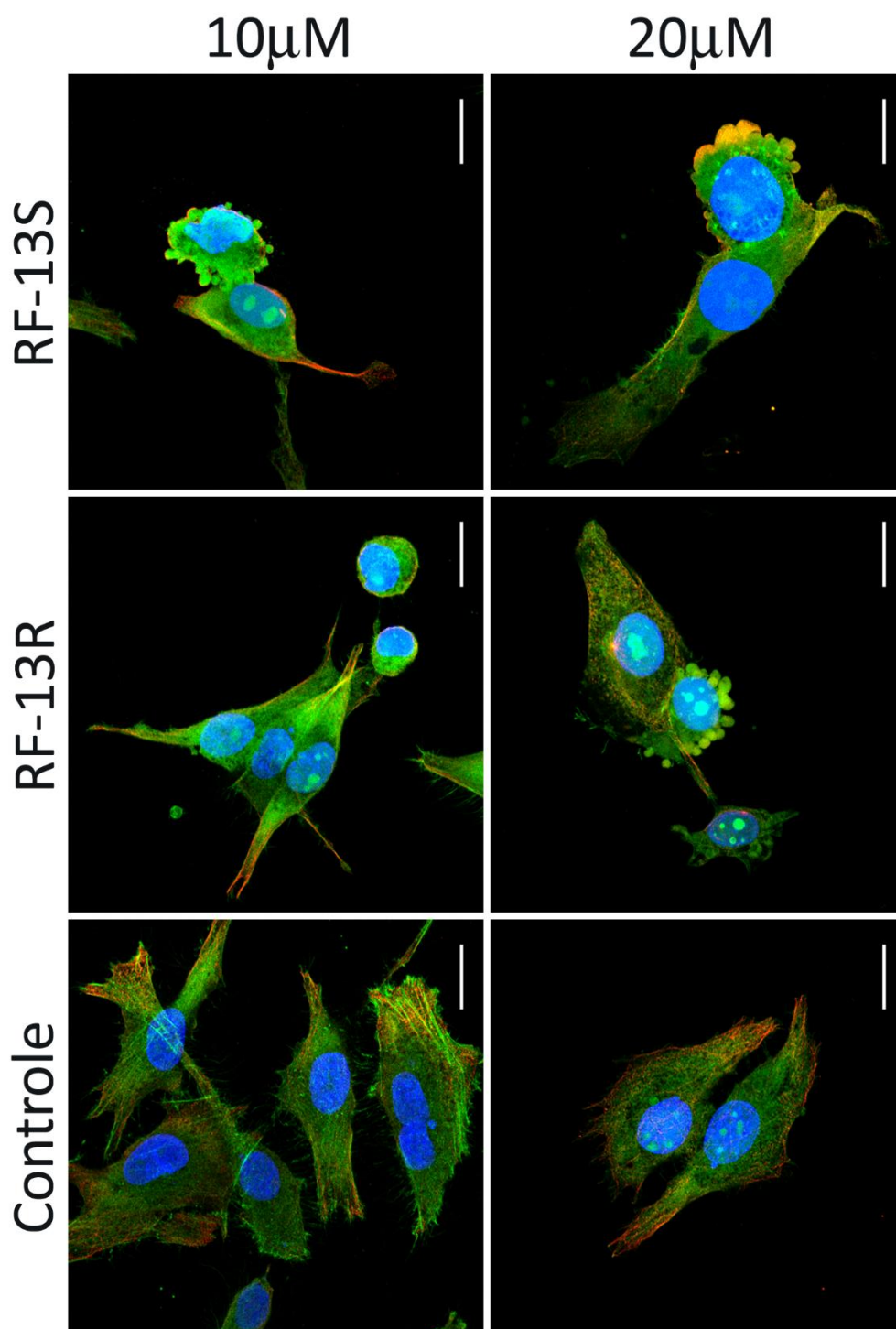


Figura 8 – Imagens de imunofluorescência da linhagem SK-Mel-28 sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. Actina marcada faloidina-FITC (verde), tubulina marcada com anti- α -tubulina (anticorpo secundário mouse-CY5 – vermelho) e núcleos corados com DAPI em azul. Barras correspondem a 20 μ m.

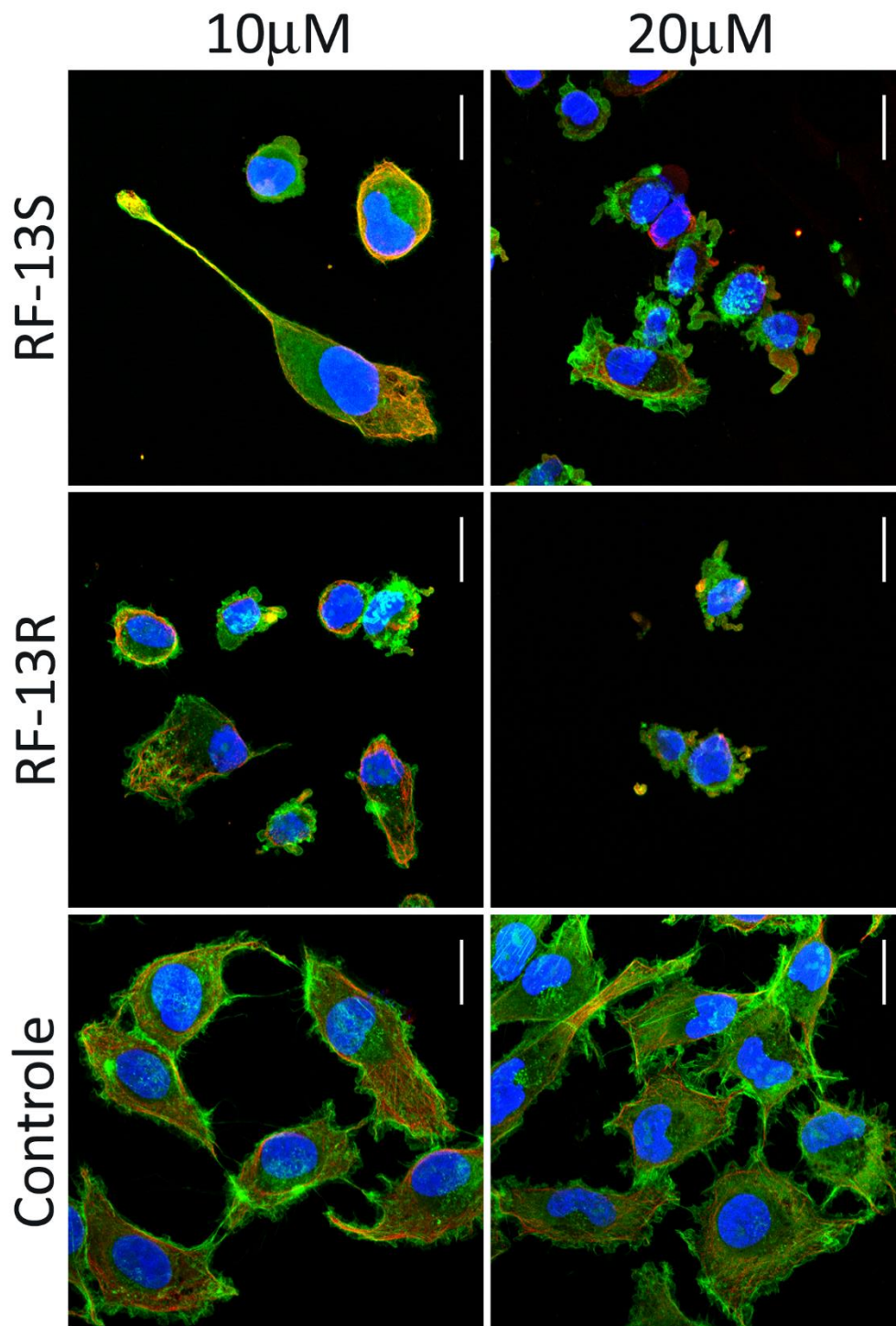


Figura 9 – Imagens de imunofluorescência da linhagem SK-Mel-147 sob efeito dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. Actina marcada faloidina-FITC (verde), tubulina marcada com anti- α -tubulina (anticorpo secundário mouse-CY5 – vermelho) e núcleos corados com DAPI em azul. Barras correspondem a 20 μ m.

4.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA – CIRCULARIDADE

Um resultado relevante encontrado nos experimentos de imunofluorescência foi a indução de *blebs* de membrana nas células tumorais após o tratamento com os enantiômeros. A fim de validar este resultado, realizamos uma análise morfométrica de células da linhagem SK-Mel-147, que apresentou alterações expressivas na análise de imunofluorescência, no aparelho Amnis (GE Healthcare, EUA). Este equipamento consiste em um citômetro de fluxo com um sistema de fotodocumentação acoplado, que captura imagens de cada evento (cada célula que passa pelo detector) em tempo real, por um microscópio de contraste de fase e fluorescência, ou seja, cada evento gera, além de um ponto em gráfico *dot plot*, imagens (uma em contraste de fase e uma imagem de fluorescência para cada canal que estiver sendo adquirido). Assim sendo, a partir dos *gates* que vão sendo feitos para delimitar a população de interesse dentro da amostra, é possível eliminar da análise células mortas e *debris*, bem como células hipertetraploides e grumos de células. Desse modo, pudemos avaliar o perfil de circularidade de uma população muito bem definida a partir de parâmetros diversos, como conteúdo de DNA e dimensão celular.

Esta análise é relevante para quantificar o processo de perturbação morfológica, pois analisa células individualmente e as caracteriza com base em algoritmos do próprio aparelho, o que torna os resultados menos propensos a erros derivados da subjetividade do operador, como por exemplo em contagens de células ao microscópio de luz ou fluorescente.

A partir dos dados já adquiridos e refinados com os *gates*, pudemos estabelecer duas populações, com base na morfologia avaliada sob microscopia de contraste de fase: uma população de alta circularidade e uma população de baixa circularidade (Figura 10). Este parâmetro é baseado na razão dos raios da célula em diferentes orientações, ou seja, uma célula arredondada, sem formação de *blebs* – vale lembrar que neste ensaio todas as células estão soltas e, por princípio, arredondadas – apresentaria uma diferença muito pequena entre os seus raios, independentemente do plano analisado, enquanto uma célula que apresenta *blebs* de membrana vai ter diferenças entre os seus raios (Figura 11).

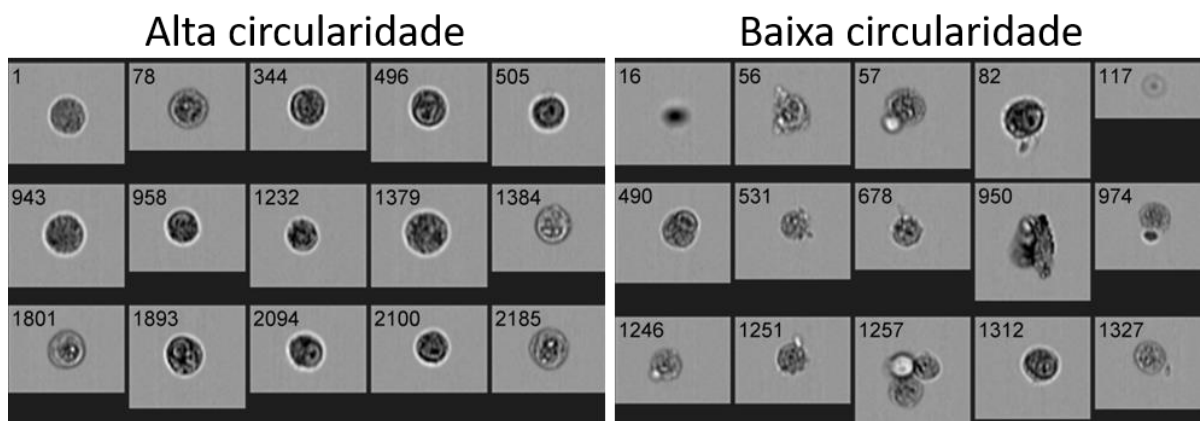


Figura 10 – Fotomicrografias de contraste de fase de células representativas de cada população. Do lado esquerdo, podemos ver exemplares de células com alto grau de circularidade, e do lado direito, exemplares de baixo grau de circularidade, evidenciando a presença de *blebs* de membrana (eventos 56, 57, 1251), bem como a presença de agregados de células (evento 1257).

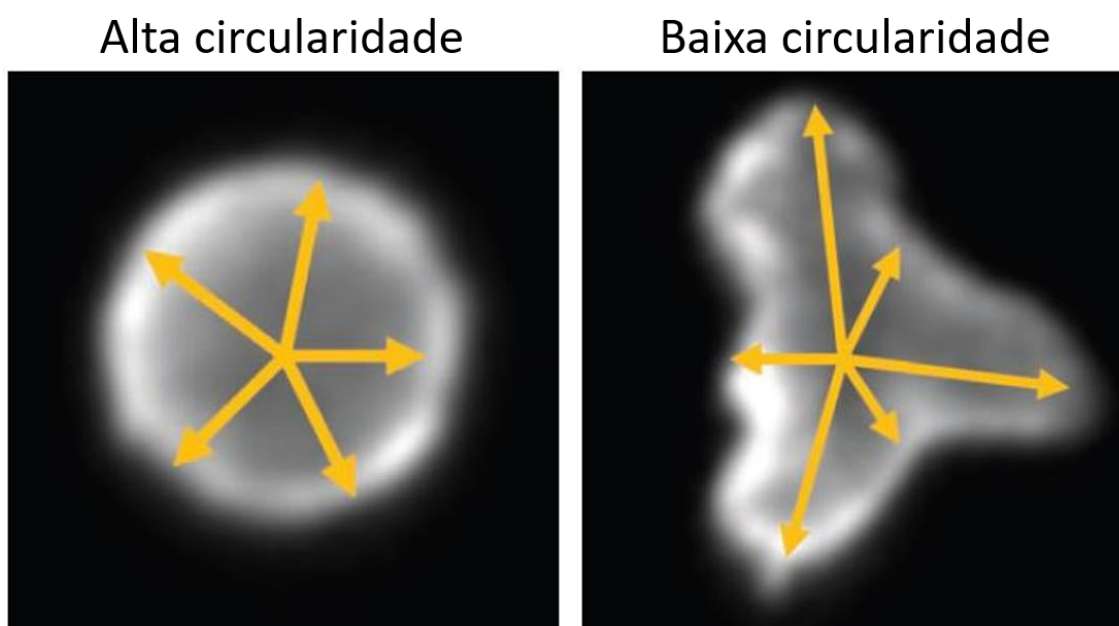


Figura 11 – Parâmetro analisado pelo software do aparelho Amnis (GE) para a determinação do grau de circularidade da célula. Fonte: Folder de divulgação do aparelho. (Adaptado do folder de divulgação do aparelho).

Com base nesta distinção, analisamos a frequência normalizada dessas duas populações na amostra e pudemos verificar na figura 12 que, mesmo no controle, há uma proporção considerável de células com baixa circularidade. Foi interessante encontrar, portanto, uma diminuição na frequência de células de baixa circularidade após o tratamento com o composto RF-13R a 10 μ M, o que sugere uma diminuição da formação de *blebs* neste tratamento; entretanto, é possível que as células com os *blebs* tenham sido excluídas dos

parâmetros nos sucessivos *gates* até a obtenção da população a ser analisada. Diferentemente, o composto RF-13S induz aumento na frequência de células de baixa circularidade mesmo na concentração mais baixa (10 μ M), induzindo um pico até mesmo maior que o encontrado na concentração de 20 μ M.

O tratamento com a concentração de 20 μ M de ambos os compostos também induziu aumento da frequência de células com baixa circularidade, condizente com um efeito concentração-dependente. Estes resultados apontam para uma diferença no potencial destrutivo dos enantiômeros, com o composto RF-13S apresentando capacidade de induzir a formação de *blebs* na concentração de 10 μ M, em concordância com os resultados encontrados no ensaio de imunofluorescência.

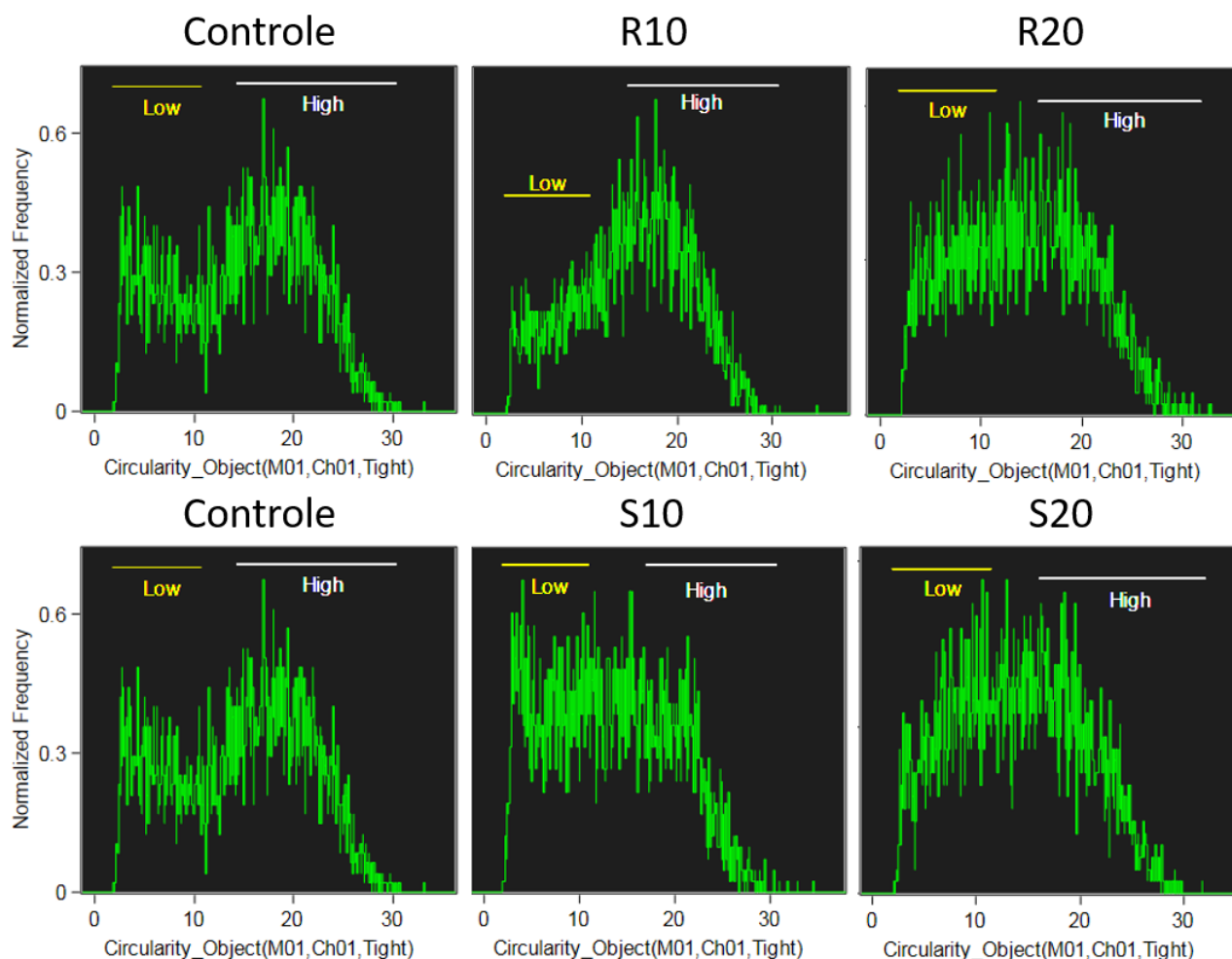


Figura 12 – Análise morfométrica de células da linhagem SK-Mel-147. Os gráficos mostram a frequência normalizada de populações com baixa (*low*) e alta (*high*) circularidade após o tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M (R10 e S10) e 20 μ M (R20 e S20).

4.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS – MICROSCOPIA EM TEMPO REAL

Para avaliar o processo de formação dos *blebs* e os eventos que se sucedem, realizamos um ensaio de microscopia em tempo real com células das linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147. Usamos estas duas linhagens pois todas as linhagens celulares de melanoma metastático apresentaram níveis similares de perturbação de citoesqueleto na análise de imunofluorescência; portanto, reduzimos a análise para um número menor de linhagens, utilizando uma linhagem com um grau mais baixo de mutações (SK-Mel-147 – NRAS^{Q61R}) e uma linhagem com mutações em diferentes genes-chave para o desenvolvimento e estabelecimento de um fenótipo metastático mais agressivo (SK-Mel-28 – BRAF^{V600E}, PTEN^{T167A} e p53^{L145R/R273H}).

Para o ensaio, as células foram tratadas com os enantiômeros RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M e a progressão das alterações morfológicas foi acompanhada durante o período de 65 horas, com captura de imagens a cada 30 minutos. As figuras 13 e 14 são representativas do *status* de cada tratamento para as linhagens SK-Mel-147 e SK-Mel-28, respectivamente.

Na linhagem SK-Mel-147 (figura 13), as alterações morfológicas começaram a aparecer a partir de 13 horas de tratamento, período no qual algumas células perdiam adesão celular e morfologia típica, sendo que o processo desde a primeira movimentação atípica até o completo arredondamento da célula durava em torno de 3 horas. Todos os tratamentos apresentaram aproximadamente as mesmas condições de tempo de estabelecimento das alterações, entretanto a concentração mais alta (20 μ M) dos compostos tinha efeitos mais graves comparados à concentração de 10 μ M. Entre os compostos, também encontramos diferenças expressivas: o composto RF-13S apresentou efeitos mais drásticos que seu enantiômero, comprometendo mais de 90% das células até o fim do período de observação das células tratadas com a concentração de 20 μ M.

Já na linhagem SK-Mel-28 (Figura 14), do mesmo modo que nos ensaios de imunofluorescência, os compostos não apresentaram efeitos tão graves quanto os encontrados na linhagem SK-Mel-147, não havendo tantas células com perda de morfologia característica e desenvolvimento de *blebs*; entretanto, as células que apresentaram alterações, começaram a apresentar perda de morfologia típica em um tempo mais curto (6

horas de tratamento). Um evento que parece ser consistente nesta linhagem é que algumas células encontram dificuldade em soltar as adesões da parte posterior da célula e, após estiramento, a adesão posterior se solta ou se rompe, mas em ambos os cenários a célula entra em colapso e perde completamente a morfologia característica e desenvolve *blebs* de membrana. Além disso, no tratamento com o composto RF-13S na concentração de 20 μM , pudemos verificar em algumas células várias projeções pequenas (como pseudópodos) em todo o perímetro da adesão ao substrato, embora nenhuma delas maturasse, resultando em uma célula não-migratória.

Outro evento relevante encontrado em ambas as linhagens foi que, embora proporcionalmente em baixa quantidade, células multinucleadas ou com grande volume citoplasmático eram as primeiras a entrar em colapso, o que pode estar relacionado com um alto grau de instabilidade genética e alta atividade metabólica, respectivamente. Em suma, os resultados mostram que, mesmo sofrendo efeitos menos graves que a linhagem SK-Mel-147, a linhagem SK-Mel-28 também apresentou uma diferença de resposta entre os compostos RF-13R e RF-13S, com o último apresentando efeitos mais drásticos em relação ao anterior.

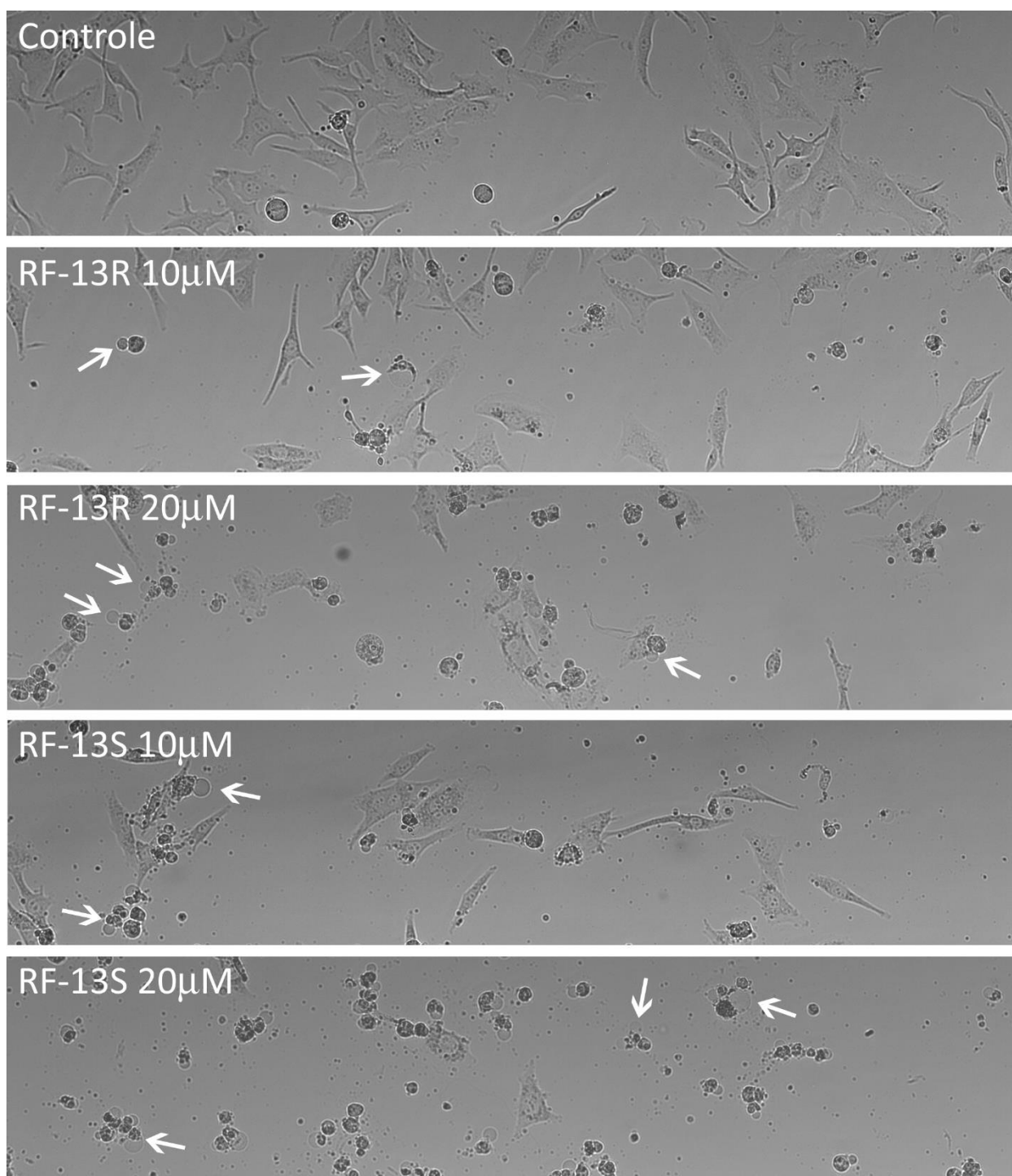


Figura 13 – Fotomicrografias de células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μM e 20 μM . Cada imagem deste painel foi obtida em um tempo entre o período de 33 horas e 40 horas e 30 minutos. O período total de aquisição foi de 65 horas. No controle, as células arredondadas estão sofrendo mitose. As setas evidenciam a presença de *blebs* de membrana.

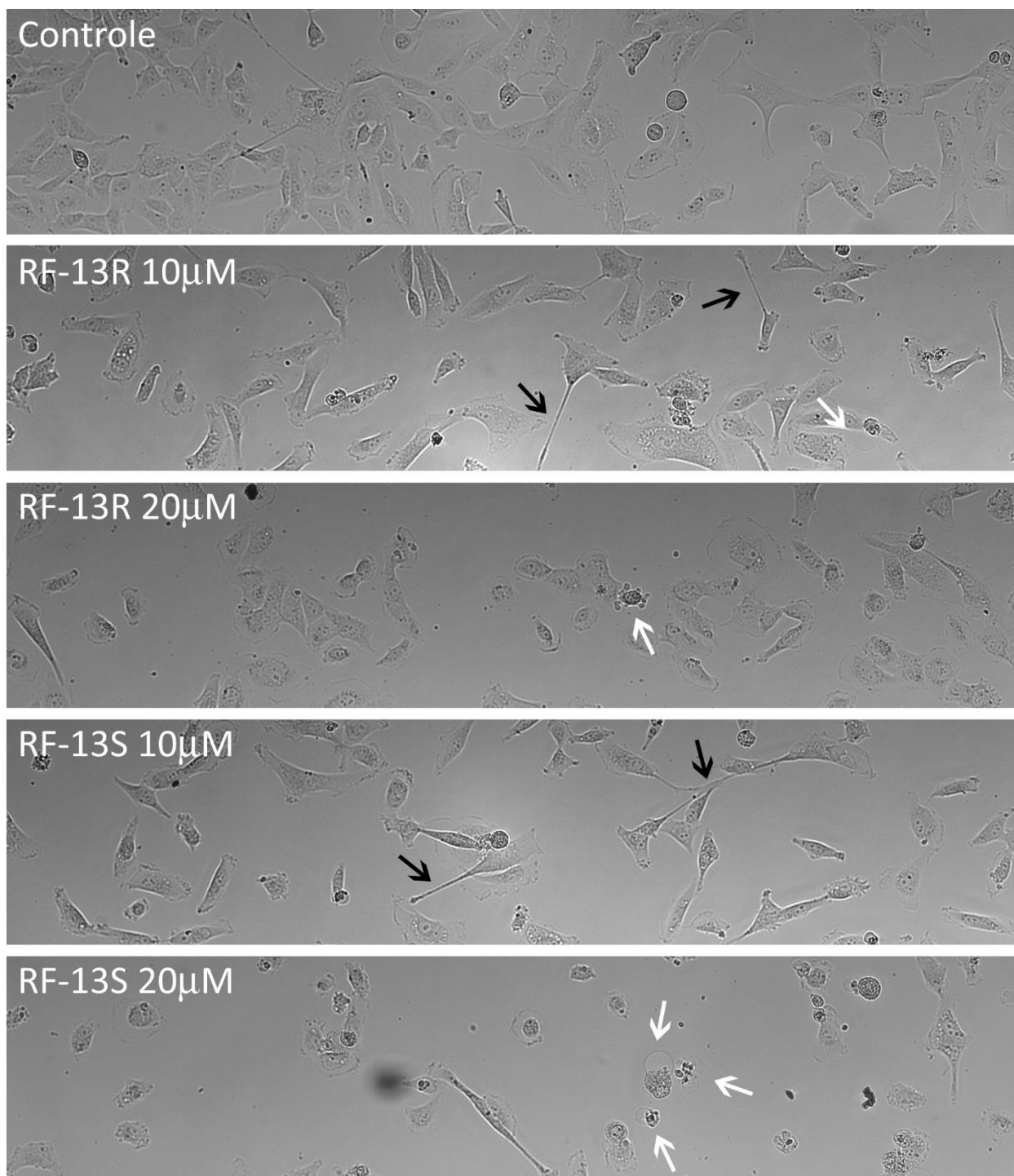


Figura 14 – Fotomicrografias de células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 µM e 20 µM. Cada imagem deste painel foi obtida em um tempo entre o período de 12 horas e 30 minutos e 48 horas e 30 minutos. O período total de aquisição foi de 65 horas. No controle, as células arredondadas estão sofrendo mitose. As setas brancas evidenciam a presença de blebs de membrana e as setas pretas evidenciam prolongamentos resultantes da deficiência na soltura da adesão celular.

4.5 CICLO CELULAR

Juntamente com as alterações morfológicas, analisamos o perfil de ciclo celular das linhagens tumorais tratadas com os enantiômeros de telúrio RF-13R e RF-13S nas mesmas concentrações de 10 μM e 20 μM por 24 horas. Diferentemente dos resultados de morfologia encontrados, que apresentavam relativa consistência entre as diferentes linhagens até então, os ensaios de ciclo celular apresentaram dois tipos de resposta dependendo da linhagem celular: aumento de população G2/M ou discreto aumento de população G1 (porcentagem de células em cada fase do ciclo listada na tabela 3).

Nesta abordagem, é possível avaliar o perfil de ciclo celular e suas alterações, que levam ao acúmulo de células em uma determinada fase, como, por exemplo: um bloqueio em mitose leva ao acúmulo de população em fase G2/M, ou uma situação de privação de nutrientes faz com que as células parem de proliferar, levando ao acúmulo de população em G1. Assim sendo, o objetivo desta análise é verificar se, além da indução de alterações morfológicas, essas organoteluranas induzem alguma perturbação na progressão do ciclo celular.

Na linhagem HT-144 (Figura 15), pudemos verificar um aumento da população G2/M em todos os tratamentos, com efeitos concentração-dependentes – a concentração de 20 μM induz maior acúmulo de células em G2/M (42,88% para R20 e 40,74% para S20) que a concentração de 10 μM (34,91% para R10 e 34,74% para S10), quando comparadas ao controle (26,94% de população em G2/M). Isto pode ser visto claramente nos histogramas da figura 15, em que os picos G1 (em vermelho) diminuem em relação ao controle, enquanto o pico G2/M, embora não aumente muito em tamanho, apresenta uma base mais larga.

Similarmente, a linhagem SK-Mel-19 (Figura 16) apresentou aumento de população G2/M, porém somente na concentração de 20 μM de ambos os compostos, com 43,14% da população em G2/M para R20 e 32,71% para S20, comparado com 23,52% do controle. Todos os tratamentos diminuíram os picos de G1, porém o tratamento com o composto RF-13R na concentração de 20 μM levou a uma ablação do pico G1, sendo que 43,14% das células estavam em G2/M e 36,88% estavam em S, com somente 12,95% de células em G1 (no controle, 54,75% das células se apresentavam na fase G1).

Já a linhagem SK-Me-28 (Figura 17) apresentou um aumento de população G1 na concentração mais alta de ambos os compostos (20 μ M), passando de 63,09% no controle para 72,30% no tratamento com R20 e 67,02% com S20, bem como diminuição de população em fase S. Do mesmo modo, a linhagem SK-Mel-147 (Figura 18) apresentou aumento de população G1 em todos os tratamentos, sendo mais expressivo na concentração de 20 μ M do composto RF-13R (67,72%) e ambas as concentrações do composto RF-13S (66,23% para 10 μ M e 66,67% para 20 μ M), contra 59,09% de população em G1 para o controle; estes resultados obtidos para a linhagem SK-Mel-147 vêm ao encontro daqueles obtidos nas análises citotóxicas e morfológicas, que mostravam um efeito mais potente do composto RF-13S (capaz de induzir alterações na concentração de 10 μ M).

Embora as condições encontradas nas linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147 sejam mais sutis do que as encontradas para as linhagens HT-144 e SK-Mel-19, ambas as condições parecem ser responsáveis por alterações expressivas na homeostase celular. Os resultados obtidos para as linhagens HT-144 e SK-Mel-19 mostram efeitos de perturbação levando a parada do ciclo em fase G2/M, enquanto as linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147 apresentaram aumento de população em fase G1. Em suma, os resultados parecem apontar para uma indução de bloqueio de progressão de ciclo celular pelos compostos RF-13R e RF-13S em diferentes pontos dependendo da linhagem celular, o que provavelmente corresponde a diferentes mecanismos de ação dos mesmos compostos nas diferentes linhagens celulares. Deve-se também levar em conta que os resultados encontrados na linhagem SK-Mel-19 (diminuição expressiva de população em fase G1) podem ser derivados da própria sensibilidade da linhagem às manipulações (plaqueamento, tratamento, mudança de temperatura), que já foram empecilhos para outros experimentos.

Tabela 3 – Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular para as diferentes linhagens celulares após tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M

Linhagem	Fase ciclo	Controle	R10	R20	S10	S20
HT-144	G2/M	26,94	34,91	42,88	34,74	40,74
	S	14,86	11,72	9,59	12,15	15,90
SK-Mel-19	G1	57,75	51,90	45,26	51,66	39,43
	G2/M	23,52	24,76	43,14	25,46	32,71
	S	20,24	25,21	36,88	20,65	20,43
SK-Mel-28	G1	54,75	48,44	12,95	52,63	43,31
	G2/M	23,27	25,55	17,68	22,96	25,25
	S	13,20	13,08	8,70	12,74	6,68
SK-Mel-147	G1	63,09	60,64	72,30	63,35	67,02
	G2/M	27,52	25,70	25,12	24,11	25,60
	S	13,15	9,39	6,79	9,18	7,34
SK-Mel-147	G1	59,09	64,60	67,72	66,23	66,67

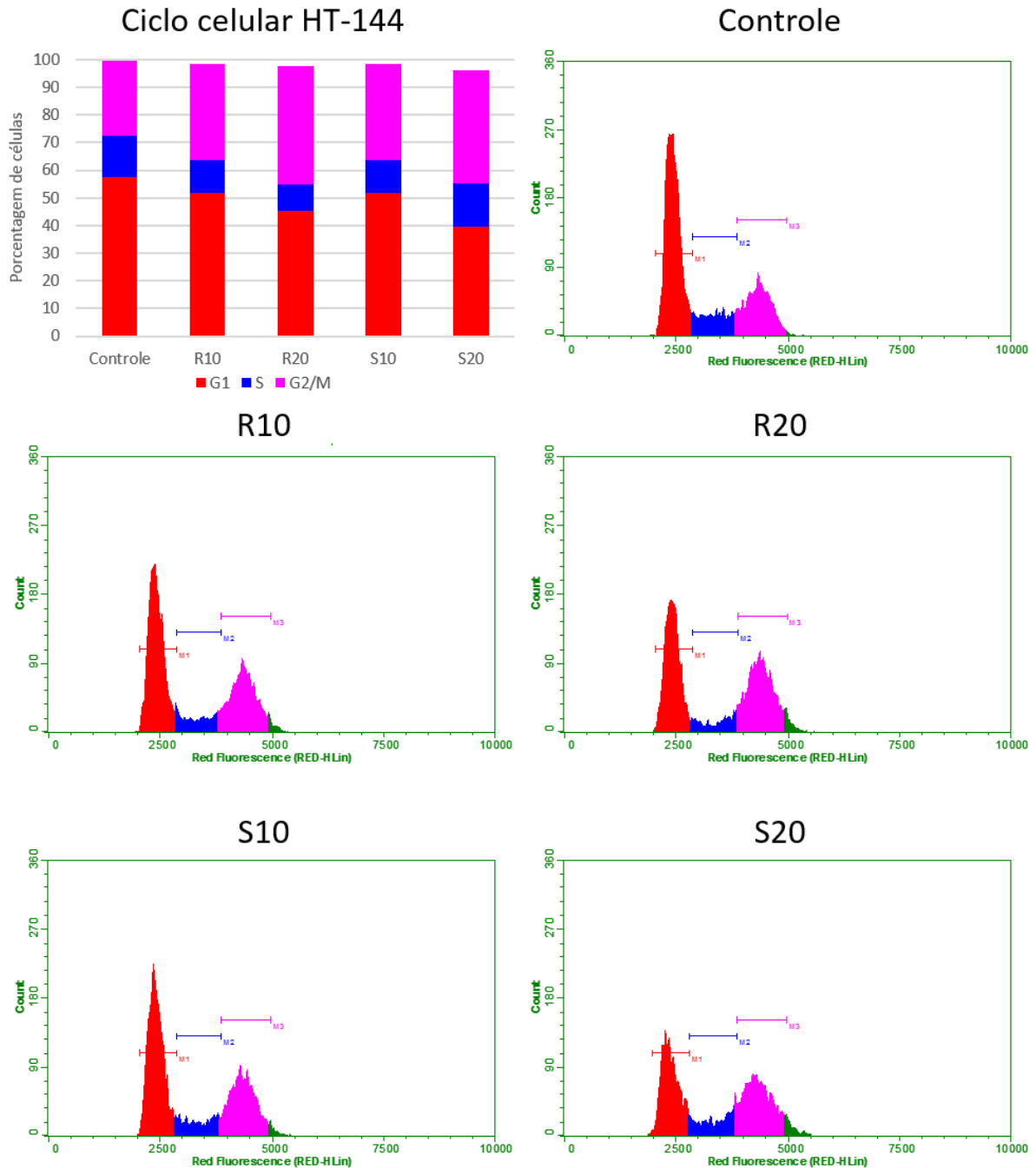


Figura 15 – Ciclo celular da linhagem HT-144. No canto superior esquerdo, o gráfico com a percentagem de células em cada fase do ciclo celular. Os outros histogramas foram extraídos diretamente do software de análise Guava Express Pro e as cores de cada região correspondem às cores do gráfico (vermelho: fase G1; azul: fase S; rosa: fases G2/M); Regiões de cor verde estão fora da análise.

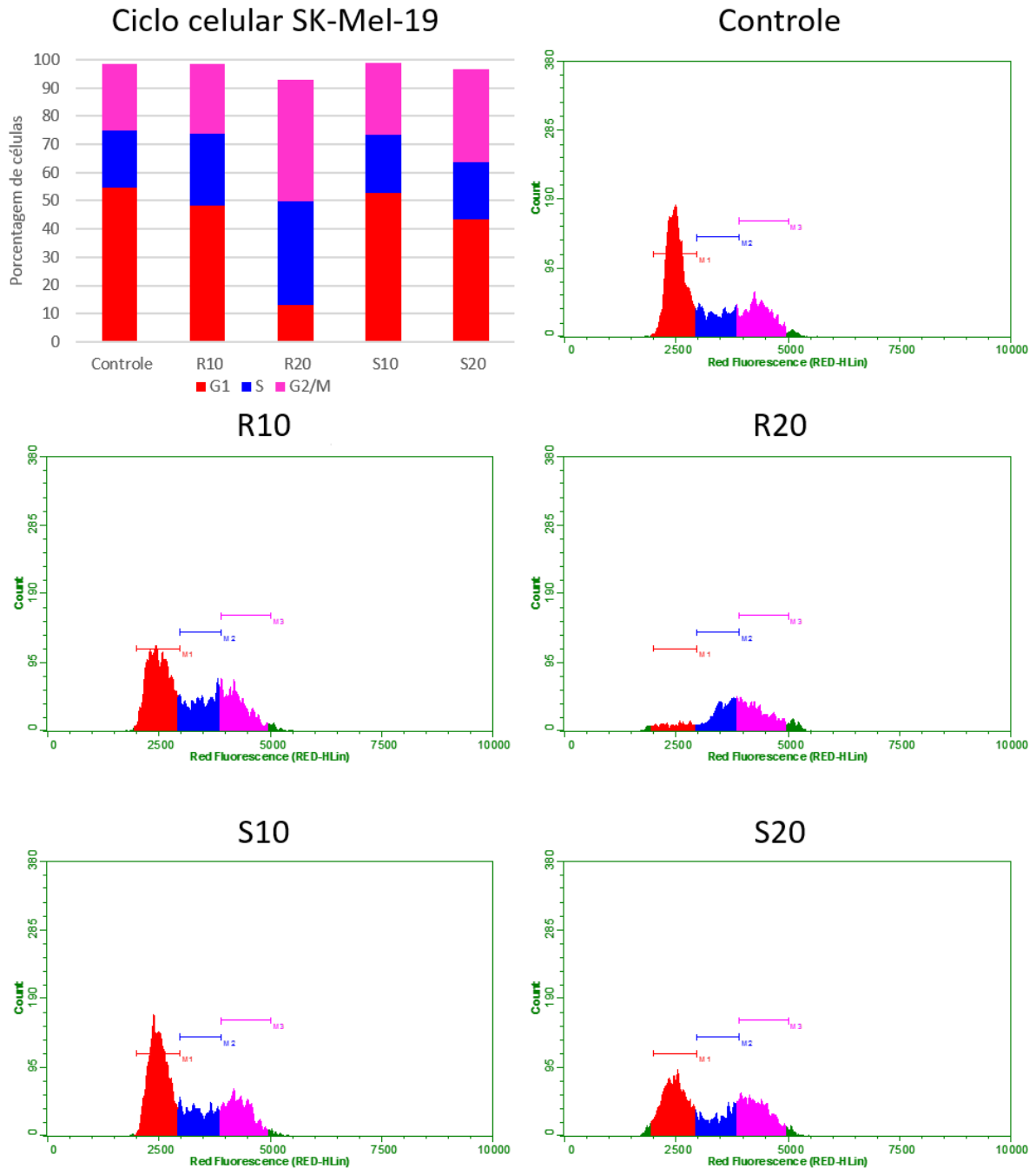


Figura 16 – Ciclo celular da linhagem SK-Mel-19. No canto superior esquerdo, o gráfico com a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. Os outros histogramas foram extraídos diretamente do software de análise Guava Express Pro e as cores de cada região correspondem às cores do gráfico (vermelho: fase G1; azul: fase S; rosa: fases G2/M); Regiões de cor verde estão fora da análise.

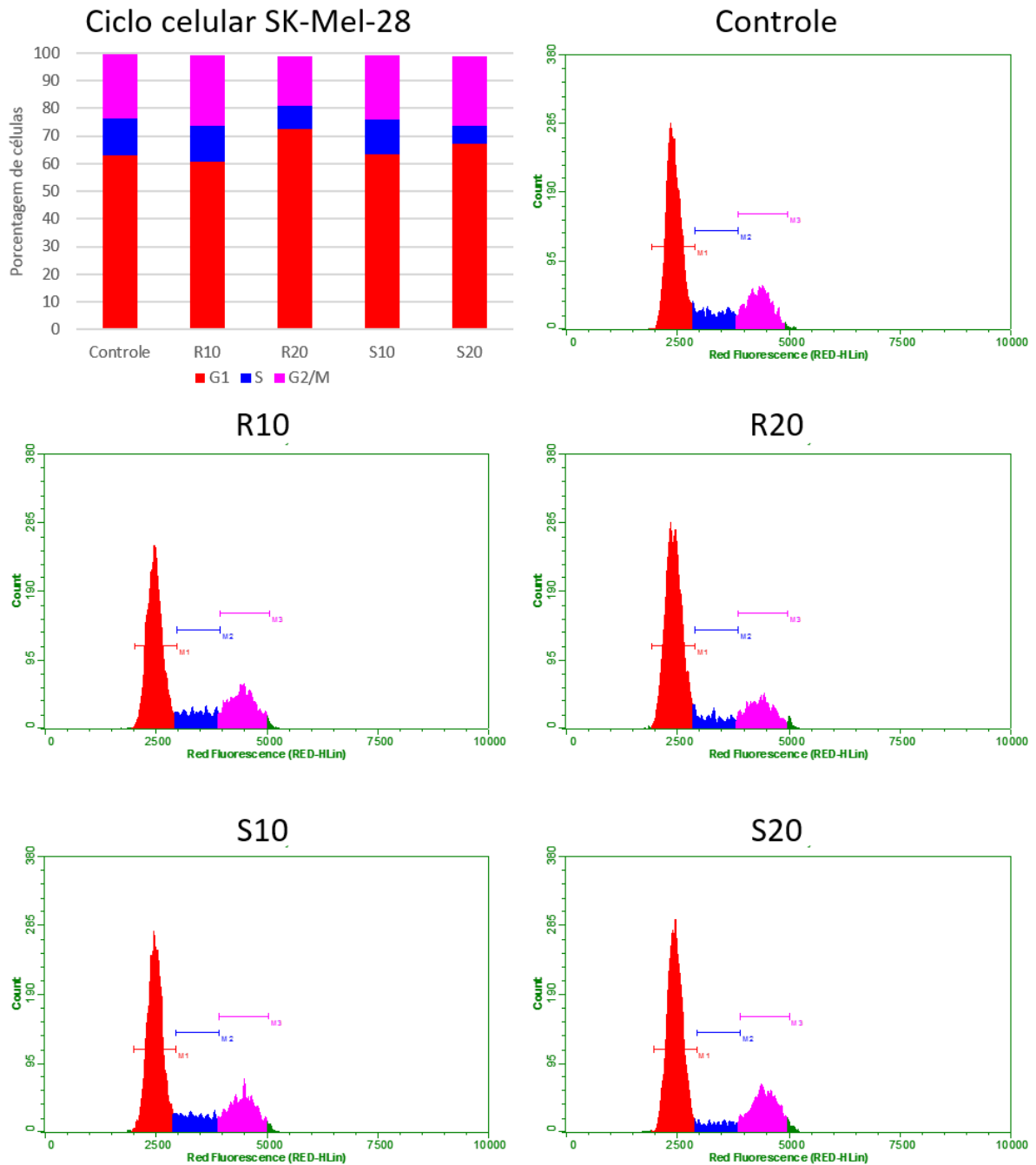


Figura 17 – Ciclo celular da linhagem SK-Mel-28. No canto superior esquerdo, o gráfico com a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. Os outros histogramas foram extraídos diretamente do software de análise Guava Express Pro e as cores de cada região correspondem às cores do gráfico (vermelho: fase G1; azul: fase S; rosa: fases G2/M); Regiões de cor verde estão fora da análise.

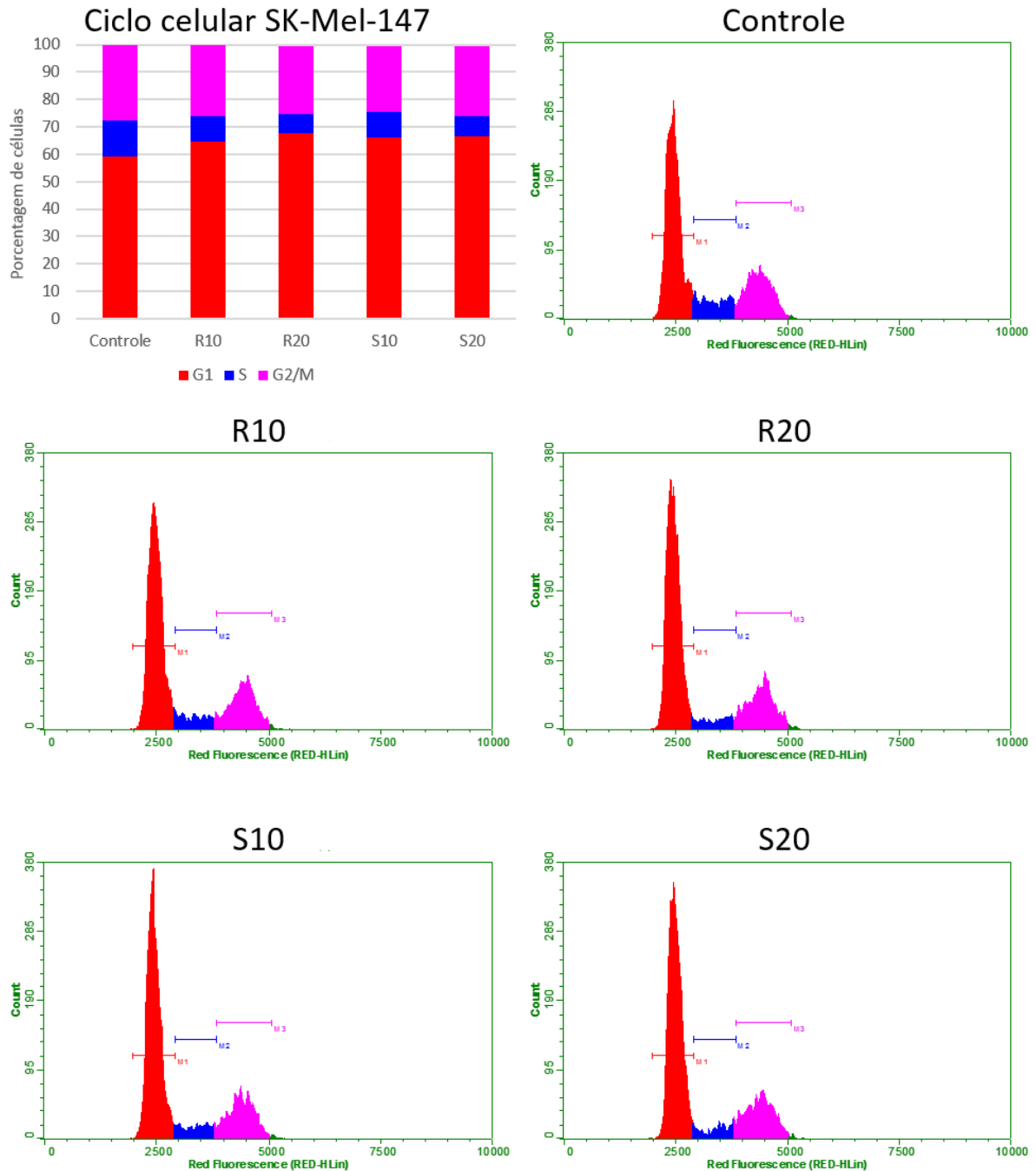


Figura 18 – Ciclo celular da linhagem SK-Mel-147. No canto superior esquerdo, o gráfico com a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. Os outros histogramas foram extraídos diretamente do software de análise Guava Express Pro e as cores de cada região correspondem às cores do gráfico (vermelho: fase G1; azul: fase S; rosa: fases G2/M); Regiões de cor verde estão fora da análise.

4.6 MORTE CELULAR

Além da perda de morfologia característica, o tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S mostravam consistentemente a indução de perda de adesão celular ao substrato, com uma porcentagem expressiva da população em suspensão no meio de cultura após o tratamento. Para verificar se as alterações morfológicas e a perda de adesão ao substrato estavam associadas ao processo de morte celular programada por via apoptótica, realizamos o experimento de detecção de caspase 9 ativada (Guava® Caspase Kit – Millipore, EUA). Este experimento baseia-se na ativação de uma molécula da cascata de sinalização de apoptose da via intrínseca (caspase 9) e o comprometimento da integridade de membrana, verificado através da penetração do corante 7-AAD nas células com membrana não-integra.

Avaliando-se estes dois parâmetros (quantidade de caspase ativada e integridade de membrana), pode-se inferir os diferentes estágios de progressão apoptótica em que as células se encontram (Figura 19), variando de apoptose intermediária (marcação positiva para caspase ativada e membrana íntegra) e apoptose tardia (marcação positiva para caspase ativada e perda de integridade de membrana), além de necrose (perda de integridade de membrana sem marcação de caspase ativada). Na fase inicial de apoptose, as células não apresentam marcação intensa para nenhum dos dois corantes, não sendo possível diferenciá-las das células viáveis.

Uma vez que verificamos em experimentos anteriores que o número de células soltas após o tratamento com os compostos nas concentrações de 10 μM e 20 μM era muito alto, inicialmente decidimos usar concentrações abaixo do IC_{50} mais baixo (SK-Mel-28 – 9 μM), com 1 μM e 5 μM pelo período de 24 horas nas linhagens SK-Mel-28 (Figura 20) e SK-Mel-147 (Figura 21); entretanto, essas concentrações não apresentaram aumento de marcação positiva para apoptose (a porcentagem de células em cada estágio de apoptose para os tratamentos com as concentrações de 1 μM e 5 μM estão listados na tabela 4). Por essa razão, decidimos retomar as concentrações de 10 μM e 20 μM para o tratamento com os compostos pelo período de 24 horas. Para todas as linhagens, usamos como controle negativo somente meio de cultura suplementado com 10% de SFB, e como controle positivo de apoptose, expusemos as células a radiação ultravioleta durante o período de 5 minutos.

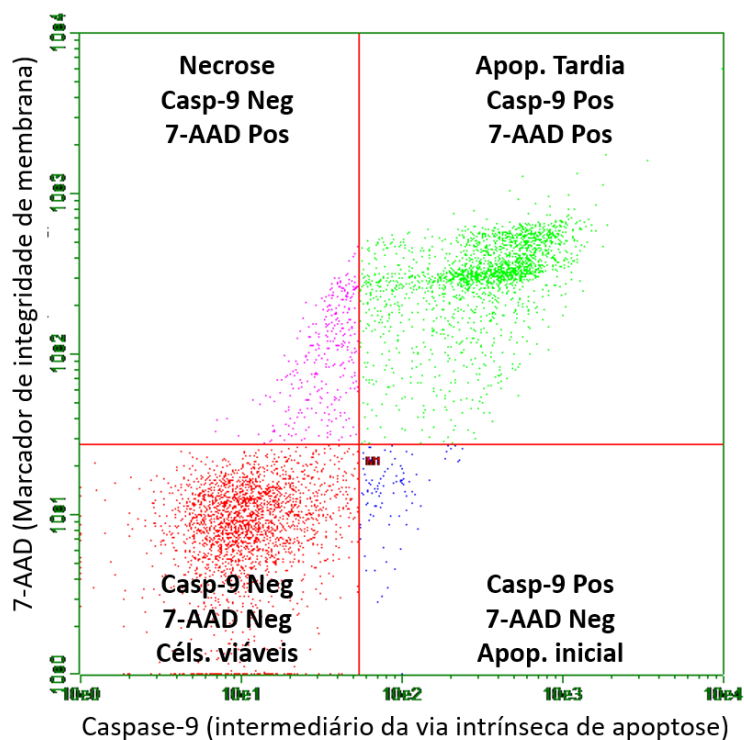


Figura 19 – modelo de gráfico de avaliação de apoptose por kit Guava® Caspase Kit. Cada quadrante representa uma diferente condição de viabilidade ou progressão de morte celular.

A linhagem SK-Mel-19 (Figura 22) apresentou indução de apoptose somente na concentração de 20 μM do composto RF-13R, com 91% de células em apoptose tardia. Este resultado coincide com o encontrado no ciclo celular, em que o tratamento com o composto RF-13R a 20 μM apresentou os efeitos mais graves de perturbação de ciclo celular.

Já a linhagem SK-Mel-28 (Figura 23) apresentou indução de apoptose na concentração de 20 μM de ambos os compostos, com 75% de células em apoptose tardia após o tratamento com o composto RF-13R e 44% com o composto RF-13S. Ao se observar este resultado, deve-se levar em conta o fato de que o IC_{50} destes enantiômeros para a linhagem SK-Mel-28 é de aproximadamente 9 μM , ou seja, a concentração que causou indução de apoptose é maior que o dobro do IC_{50} , enquanto a concentração de 10 μM de nenhum dos dois compostos induziu apoptose expressiva nesta linhagem, com 1,96% de apoptose tardia para o tratamento com o composto RF-13R e 2,6% com o composto RF-13S

Em oposição às outras duas linhagens analisadas, a linhagem SK-Mel-147 (Figura 24) não sofreu indução de apoptose em nenhuma das concentrações de ambos os compostos, o que

indica que, embora em todas as linhagens haja alterações morfológicas muito nítidas, as células em suspensão no meio de cultura encontradas após o tratamento com os compostos não parecem estar obrigatoriamente sofrendo um processo de morte celular programada (exceto em SK-Mel-28, que apresenta IC₅₀ mais baixo), mas sim a perda de adesão celular ao substrato. Entretanto, apesar da perda de adesão ao substrato, as células não sofrem o processo de apoptose, uma vez que células tumorais costumam apresentar resistência a *anoikis* (morte celular decorrente de perda de adesão ao substrato). A porcentagem de células em cada estágio de apoptose para os tratamentos nas concentrações de 10 µM e 20 µM estão listados na tabela 5.

Tabela 4 – Perfil de morte celular programada nas linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147 após tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 1 µM e 5 µM.

Linhagem/Tratamento	Células vivas	Apoptose	Apoptose	Necrose
SK-Mel-28				
Controle negativo	95,86%	2,12%	1,22%	0,80%
Controle positivo	23,42%	4,38%	67,78%	4,42%
RF-13R 1 µM	95,16%	2,88%	1,30%	0,66%
RF-13R 5 µM	94,16%	3,54%	1,42%	0,88%
RF-13S 1 µM	95,14%	2,50%	1,20%	1,16%
RF-13S 5 µM	95,40%	2,70%	1,24%	0,66%
SK-Mel-147				
Controle negativo	98,00%	0,54%	0,52%	0,94%
Controle positivo	72,66%	2,24%	15,34%	9,76%
RF-13R 1 µM	97,06%	1,42%	0,68%	0,84%
RF-13R 5 µM	97,68%	0,80%	0,64%	0,88%
RF-13S 1 µM	97,70%	0,90%	0,60%	0,80%
RF-13S 5 µM	97,30%	0,90%	0,70%	1,10%

Tabela 5 – Perfil de morte celular programada nas linhagens SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-147 após tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M.

Linhagem/Tratamento	Células vivas	Apoptose	Apoptose	Necrose
SK-Mel-19				
Controle negativo	92,64%	3,94%	2,88%	0,54%
Controle positivo	39,16%	1,92%	52,90%	6,02%
RF-13R 10 μ M	92,44%	4,30%	2,90%	0,36%
RF-13R 20 μ M	6,10%	3,00%	90,46%	0,44%
RF-13S 10 μ M	92,78%	4,42%	2,30%	0,50%
RF-13S 20 μ M	91,44%	3,48%	4,48%	0,60%
SK-Mel-28				
Controle negativo	94,48%	1,30%	3,17%	1,05%
Controle positivo	28,34%	7,58%	58,94%	5,14%
RF-13R 10 μ M	96,38%	1,18%	1,96%	0,48%
RF-13R 20 μ M	14,32%	10,26%	74,74%	0,68%
RF-13S 10 μ M	95,24%	1,44%	2,60%	0,72%
RF-13S 20 μ M	42,10%	11,28%	43,82%	2,26%
SK-Mel-147				
Controle negativo	98,52%	0,70%	0,52%	0,26%
Controle positivo	48,50%	2,02%	43,04%	6,44%
RF-13R 10 μ M	98,70%	0,54%	0,60%	0,16%
RF-13R 20 μ M	93,00%	1,32%	3,90%	1,78%
RF-13S 10 μ M	98,32%	0,92%	0,62%	0,14%
RF-13S 20 μ M	98,24%	0,42%	0,98%	0,36%

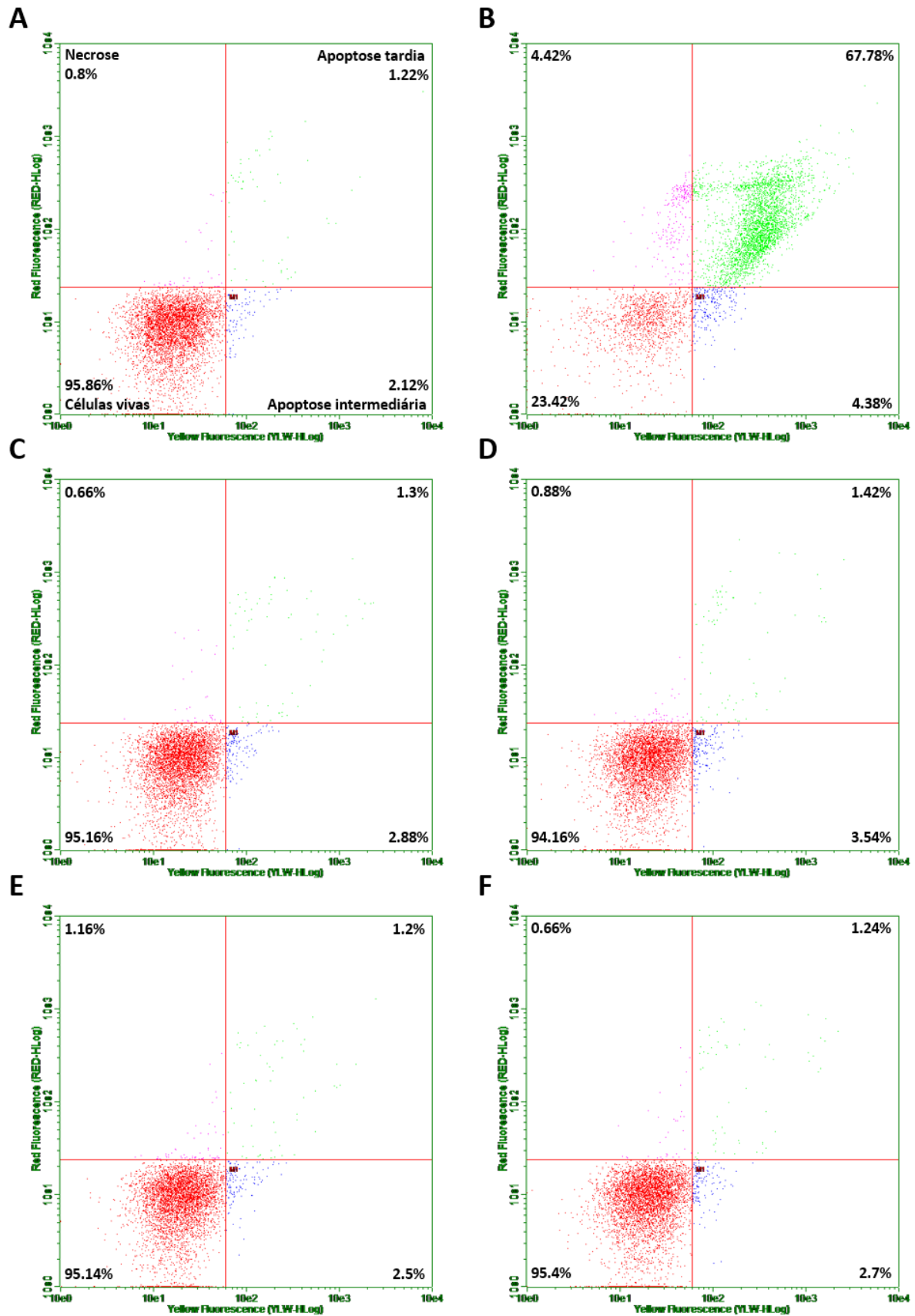


Figura 20 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-28 nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M. A: Controle negativo. B: Controle positivo. C: RF-13R 1 μ M. D: RF-13R 5 μ M. E: RF-13S 1 μ M. F: RF-13S 5 μ M.

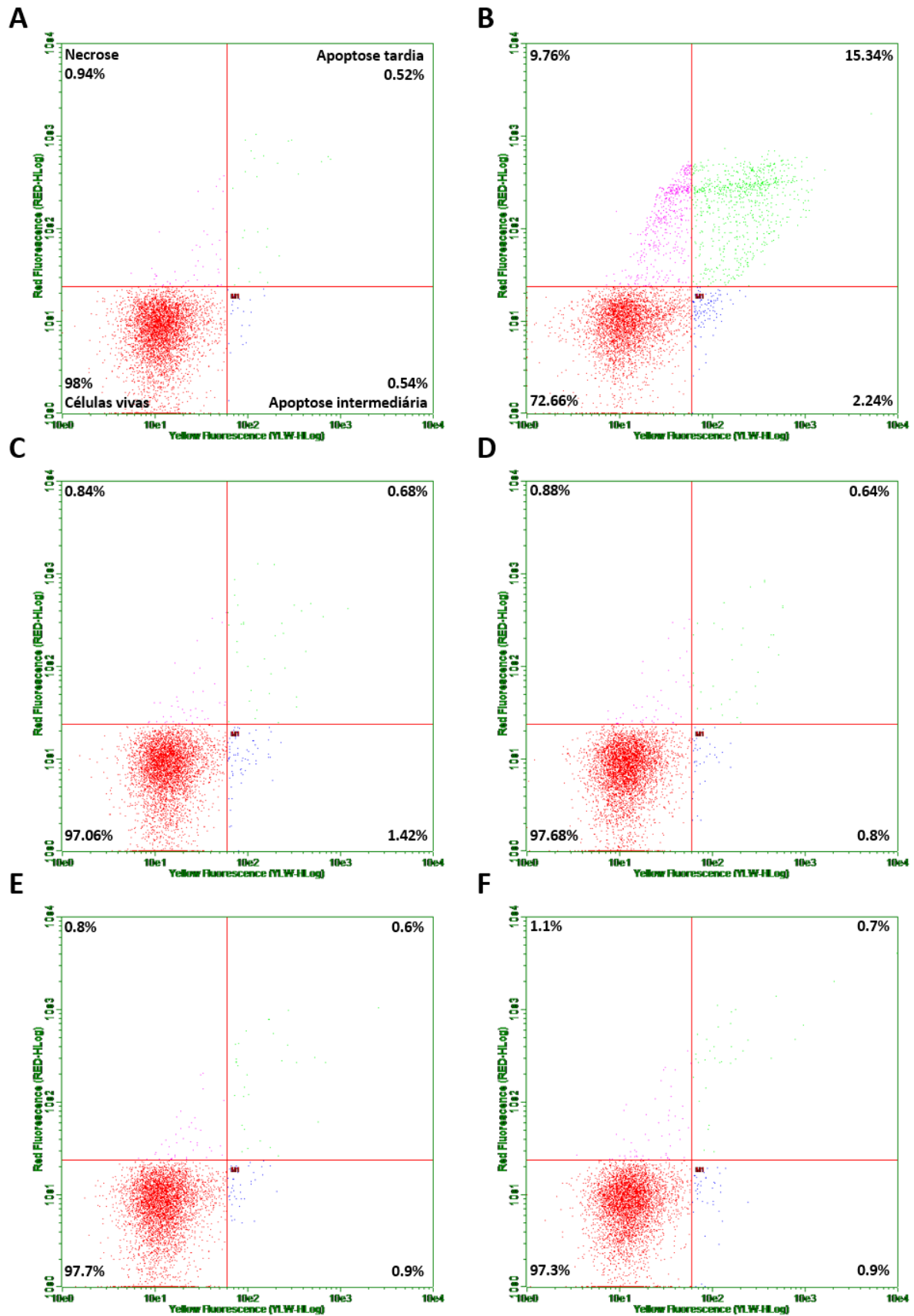


Figura 21 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-147 nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M. A: Controle negativo. B: Controle positivo. C: RF-13R 1 μ M. D: RF-13R 5 μ M. E: RF-13S 1 μ M. F: RF-13S 5 μ M.

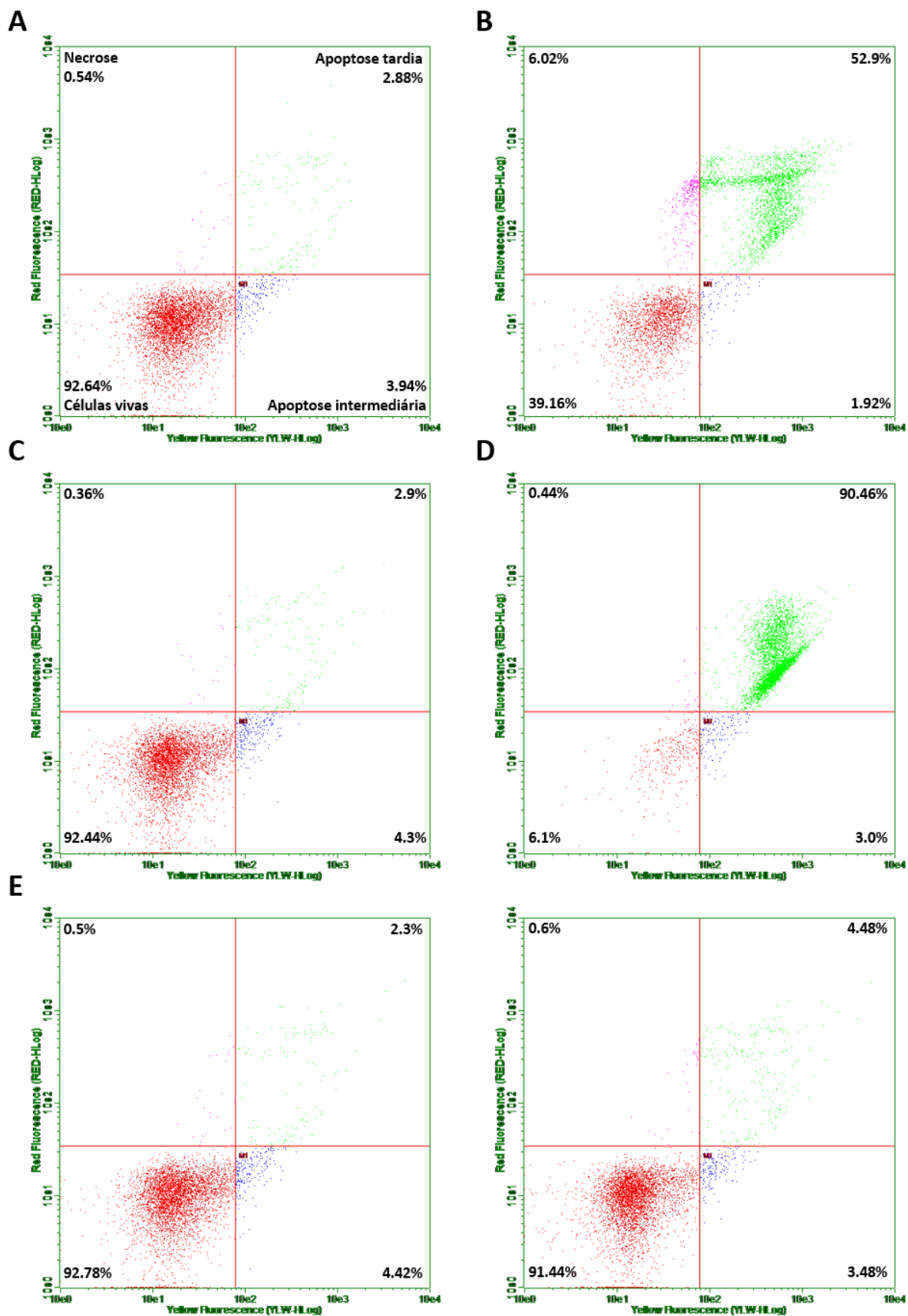


Figura 22 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-19 nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. A: Controle negativo. B: Controle positivo. C: RF-13R 10 μ M. D: RF-13R 20 μ M. E: RF-13S 10 μ M. F: RF-13S 20 μ M.

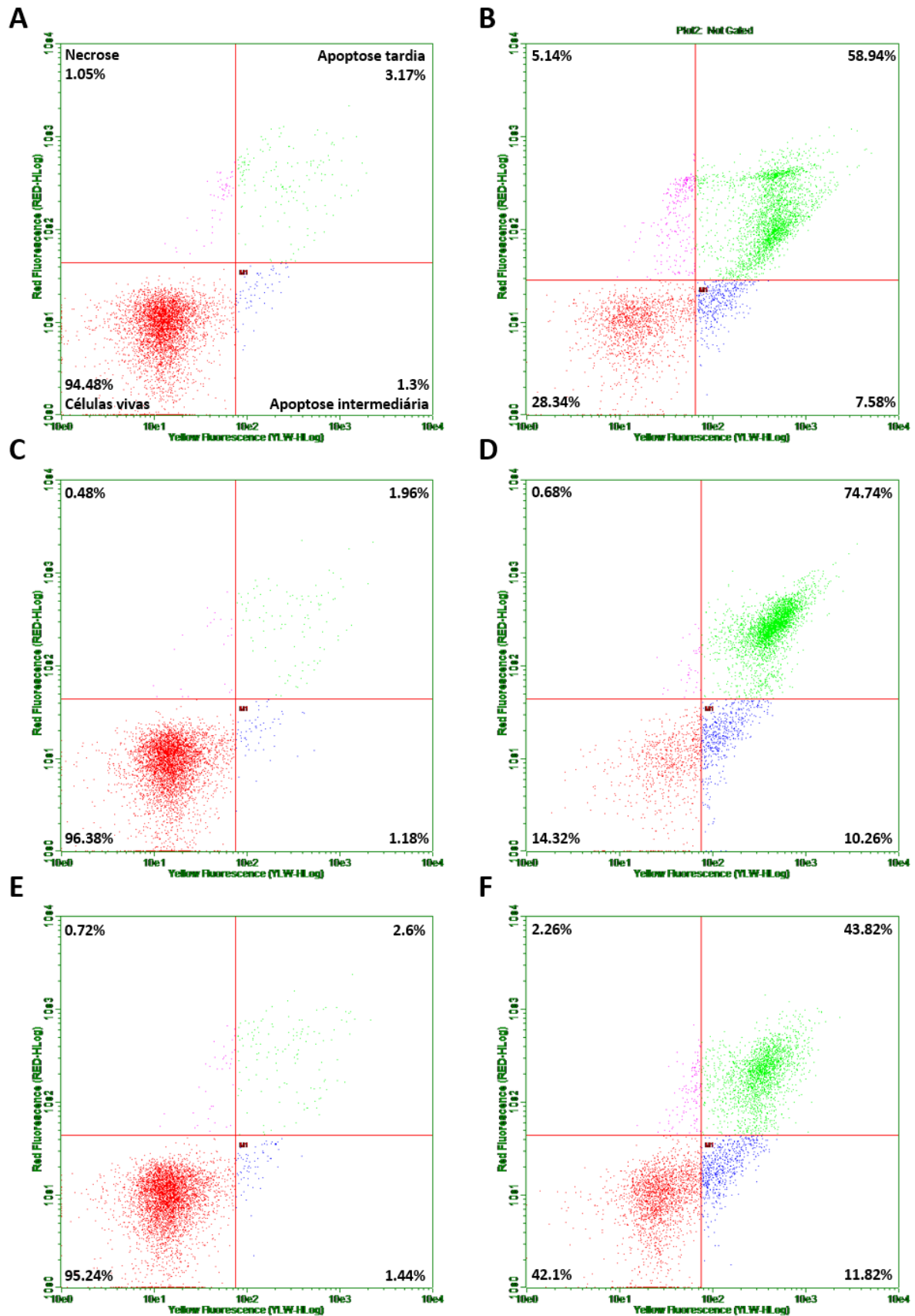


Figura 23 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-28 nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. A: Controle negativo. B: Controle positivo. C: RF-13R 10 μ M. D: RF-13R 20 μ M. E: RF-13S 10 μ M. F: RF-13S 20 μ M.

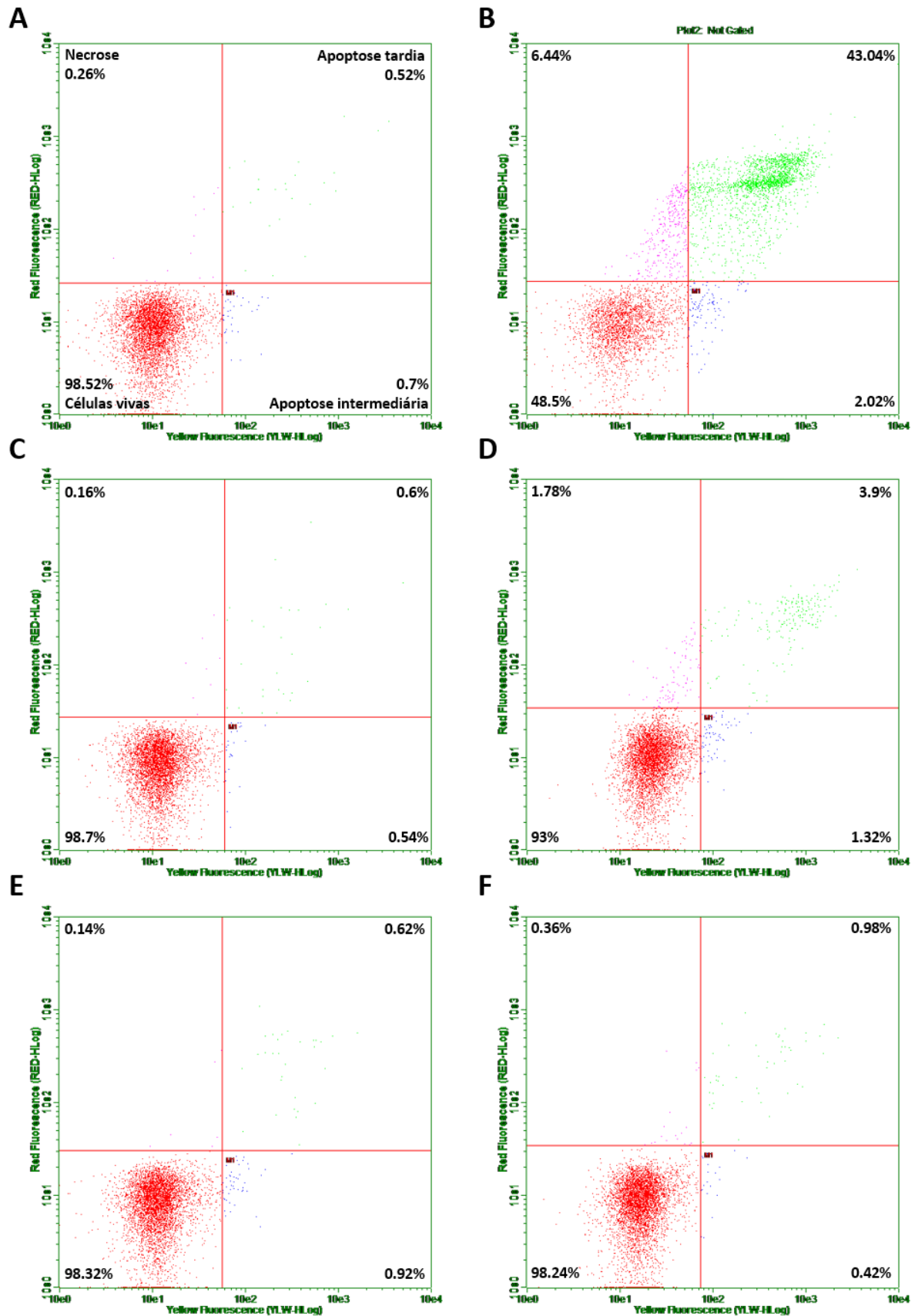


Figura 24 – Ensaio de morte celular por ativação de caspase-9 na linhagem SK-Mel-147 nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M. A: Controle negativo. B: Controle positivo. C: RF-13R 10 μ M. D: RF-13R 20 μ M. E: RF-13S 10 μ M. F: RF-13S 20 μ M.

4.7 ENSAIO DE FECHAMENTO DE FERIDA

Realizamos o ensaio de fechamento de ferida para verificar se havia comprometimento no processo de migração das linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147 após o tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μM e 20 μM . O experimento foi realizado no equipamento IncuCyte Zoom (Essen Bioscience), cujo diferencial é uma plataforma que permite a padronização da largura da ferida gerada (700-800 μm), em oposição à grande variação encontrada quando realizamos a ferida com ponteiros plásticas. Isto permitiu uma padronização muito maior do preparo da amostra, além do fato de as análises serem realizadas com o *software* do próprio aparelho. A partir das imagens adquiridas de hora em hora, é produzido um vídeo com destaque artificial para as mudanças encontradas durante o tempo. Imagens ilustrativas das alterações são fornecidas na imagem 25, que mostra os quadros do vídeo em intervalos de 12 horas de aquisição.

O intuito da realização de um ensaio de fechamento de ferida é verificar, como o próprio nome já diz, o fechamento de uma descontinuidade em monocamada confluyente de células e, a partir do comportamento destas, inferir os efeitos de compostos sobre o processo de migração. Neste experimento, partimos de feridas de largura padronizada e avaliamos os seguintes parâmetros: (a) densidade celular na ferida, ou seja, o número de células que migram para ocupar o espaço aberto pela ferida; (b) confluência da ferida – quantidade de células por área; e (c) largura da ferida, ou seja, a distância entre as bordas da ferida; e os dados foram plotados em um gráfico em que o eixo x representa o tempo e o eixo y as medidas.

Como podemos ver nas figuras 26 e 27, os controles positivo (meio DMEM/Ham-F12 suplementado com 1% de SFB) e negativo (meio DMEM/Ham-F12 suplementado com 10% de SFB) apresentaram um perfil de progressão muito similar entre si para os três parâmetros analisados em ambas as linhagens.

Para a linhagem SK-Mel-28 (Figura 26), os parâmetros densidade, confluência e largura da ferida para o tratamento com o composto RF-13R na concentração mais baixa (10 μM) acompanharam de perto os dos controles. Já a concentração mais alta (20 μM) do composto RF-13R e ambas as concentrações do composto RF-13S apresentaram diferenças entre si: podemos ver que não há recuperação de densidade e confluência da ferida após o tratamento

com R20, S10 e S20, bem como a diminuição da largura da ferida, que corresponderia à migração das células a partir das bordas.

Na linhagem SK-Mel-147 (Figura 27), mesmo a concentração mais baixa do composto RF-13R (10 μM) já leva à alteração dos parâmetros analisados, com aumento da diferença nos tratamentos R20, S10 e S20. Entretanto, após o tratamento da linhagem com o composto RF-13S na concentração de 20 μM , podemos verificar ainda um aumento na largura da ferida, por consequência da extensiva perda de adesão das células expostas a essa concentração do enantiômero.

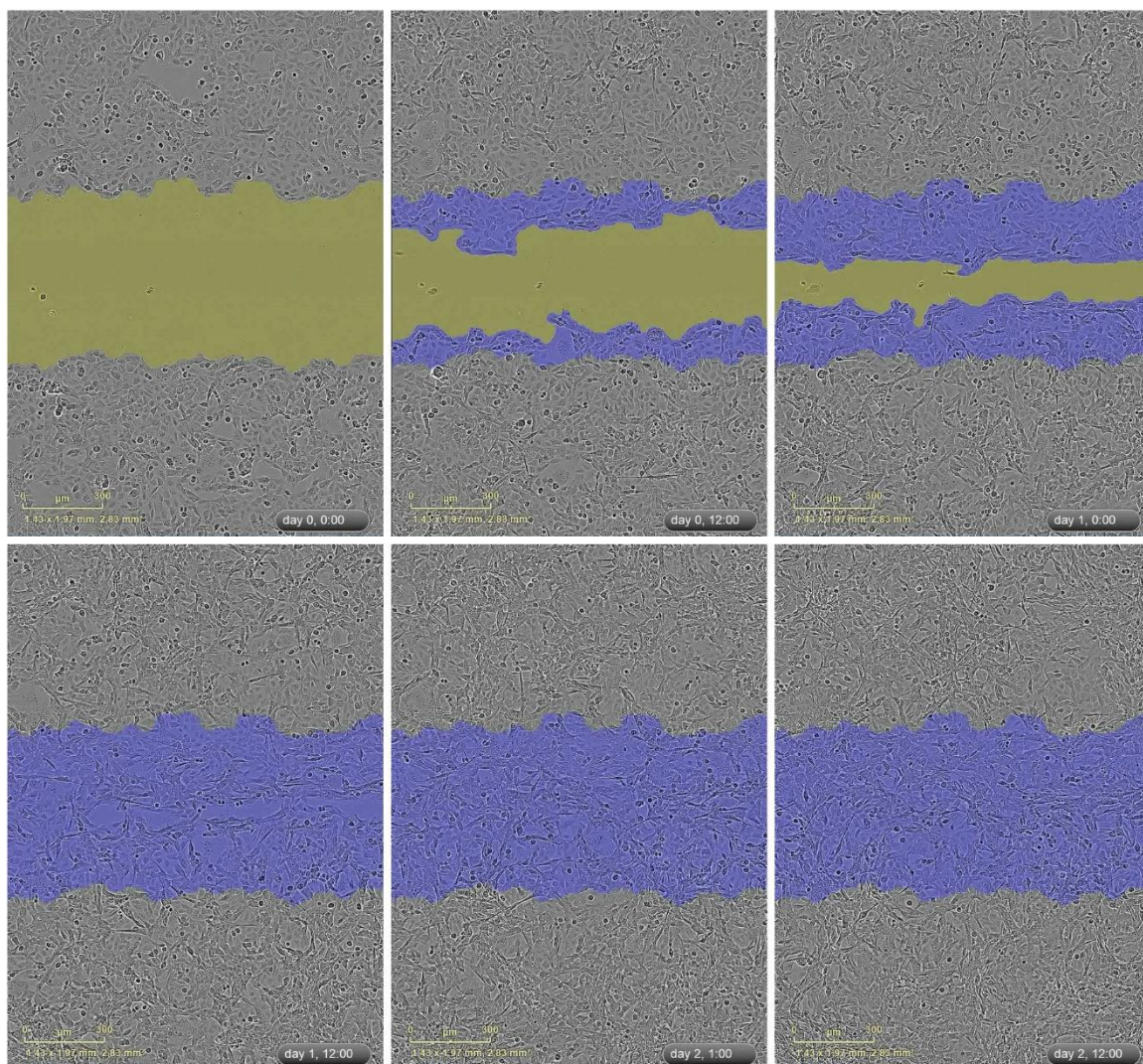


Figura 25 – Exemplo de ensaio de fechamento de ferida. Imagens de microscopia de contraste de fase com realce artificial mostrando o progresso de migração durante o fechamento da ferida na condição controle da linhagem SK-Mel-147. O primeiro quadro foi adquirido em tempo T 0h e os quadros conseguintes apresentam intervalos de 12 horas entre si. Em amarelo está representada a ferida e em azul as camadas de migração a partir das bordas e o fechamento da ferida sobre os quais as informações são medidas. Barra de tamanho representa 300 μm .

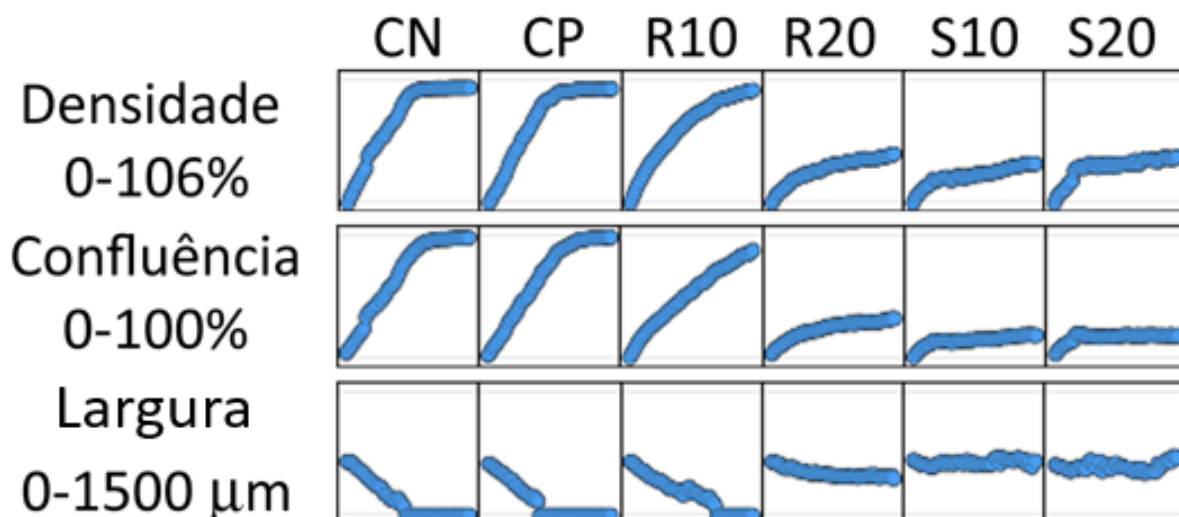


Figura 26 – Ensaio de fechamento de ferida na linhagem SK-Mel-28 tratada com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μM e 20 μM . Foram avaliados os parâmetros de densidade, confluência e largura da ferida. Os gráficos mostram a progressão destes durante o período de 62 horas. CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.

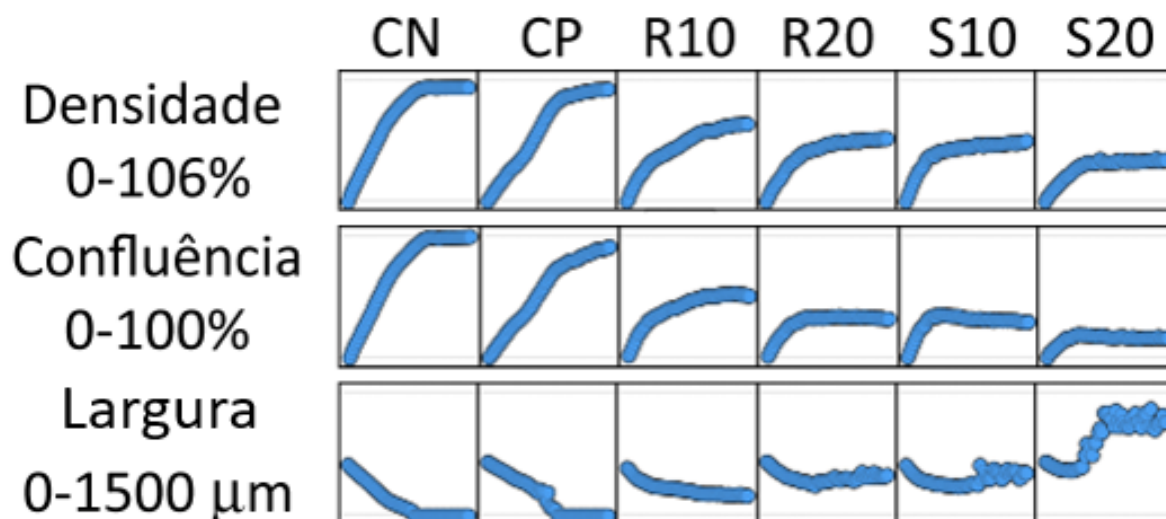


Figura 27 – Ensaio de fechamento de ferida na linhagem SK-Mel-147 tratada com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μM e 20 μM . Foram avaliados os parâmetros de densidade, confluência e largura da ferida. Os gráficos mostram a progressão destes durante o período de 62 horas. Notar que, diferentemente dos controles, após o tratamento com a concentração mais alta do composto RF-13R e ambas as concentrações do composto RF-13S, o diâmetro da ferida não diminui e chega a aumentar bruscamente no tratamento S20, consistente com a perda de adesão e morfologia das células. CN: Controle negativo; CP: Controle positivo.

4.8 MIGRAÇÃO EM *TRANSWELL*

A fim de verificar a capacidade migratória das células frente o tratamento com as organoteluranas, realizamos ensaios de migração em *transwell*. Este experimento baseia-se na habilidade das células em buscar condições que satisfaçam suas necessidades metabólicas: uma membrana de policarbonato ou nitrocelulose com poros de diâmetro definido (entre 0,4 μm e 8,0 μm) separa dois ambientes – um ambiente rico em nutrientes na porção inferior da câmara e outro pobre na porção superior. Esta barreira física exige que a célula seja capaz de promover adesões ao substrato, se movimentar nesta superfície e mudar sua conformação estrutural a fim de atravessar o poro em direção ao meio mais propício para sua proliferação, mantendo-se aderida à face inferior da membrana (Figura 28).

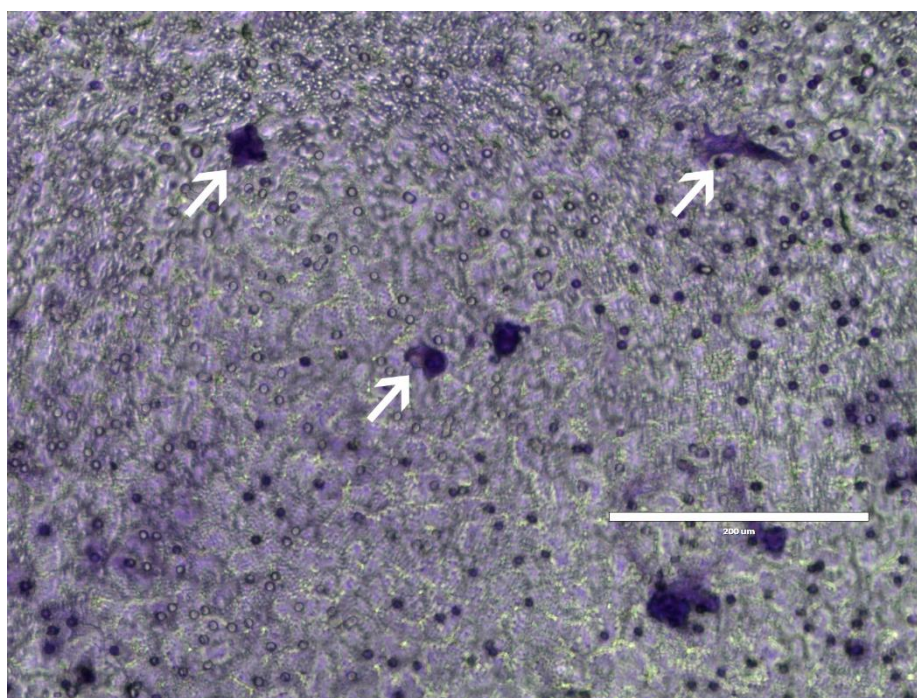


Figura 28 – Fotomicrografia de células coradas com cristal violeta aderidas à face inferior da membrana de policarbonato, visualizado em microscópio invertido de contraste de fase. Após a coloração com cristal violeta, contam-se as células que migraram para a face inferior da membrana (setas). Barra representa 200 μm .

Para a linhagem SK-Mel-28 (Figura 29), pudemos verificar que o composto RF-13R na concentração de 10 μM e o composto RF-13S em ambas as concentrações foram capazes de inibir a capacidade migratória das células, sendo que a concentração de 20 μM do composto RF-13S levou a um número de células na membrana inferior similar ao número de células presentes no controle negativo (meio de cultura com 1% SFB em ambas as câmaras).

Já para a linhagem SK-Mel-147 (figura 30), somente o composto RF-13S em sua concentração mais alta (20 μM) foi capaz de inibir de maneira significativa essa capacidade, enquanto a concentração de 20 μM do composto RF-13R levou a um aumento na migração de células para a face inferior da membrana. Em ambas as linhagens, pudemos verificar um efeito concentração-dependente para o composto RF-13S, com a concentração mais alta atingindo um número de células na face inferior próximo ao do controle negativo.

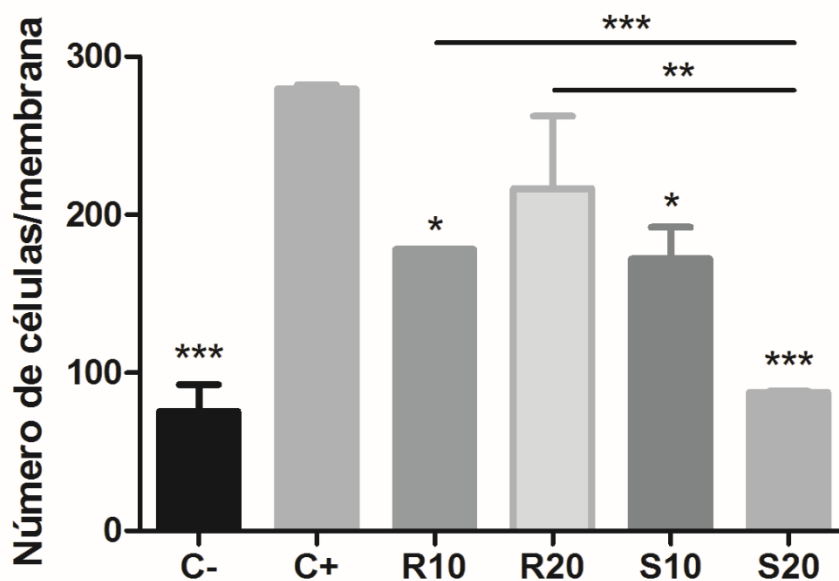


Figura 29 – Ensaio de migração em *transwell* para células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μM e 20 μM em 1% de SFB. Foram usados 10% de SFB como quimioatraente e foram contadas todas as células que atravessaram a membrana de policarbonato. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Tuckey. Barras representam o desvio padrão. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

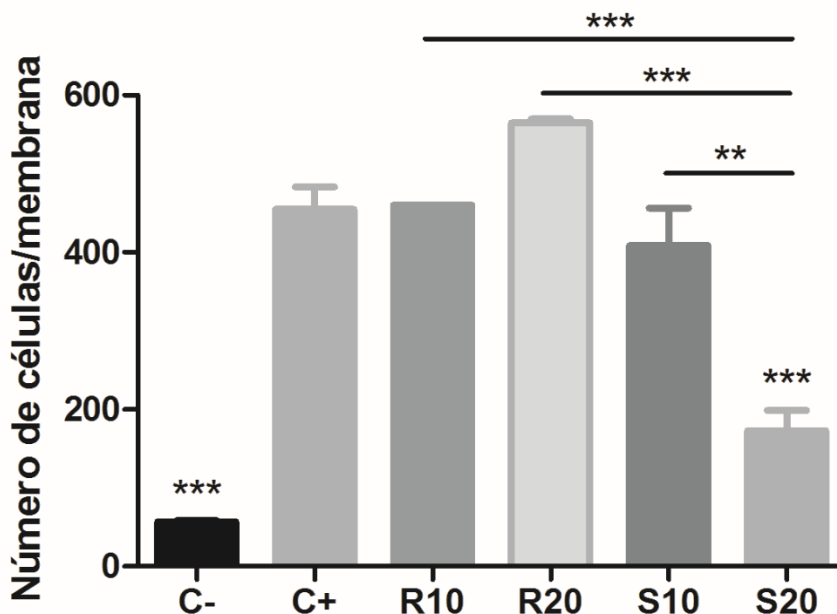


Figura 30 – Ensaio de migração em *transwell* para células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB. Foram usados 10% de SFB como quimioatraente e foram contadas todas as células que atravessaram a membrana de policarbonato. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Tuckey. Barras representam o desvio padrão. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

4.9 TIME LAPSE – DIRECIONALIDADE E VELOCIDADE

Também realizamos a avaliação de direcionalidade e velocidade de células das linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147 sob a ação dos compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M durante 24 horas. Neste experimento, era necessário acompanhar células individualmente, sem que elas se tocassem durante todo o período de análise; deste modo, plaqueamos as células a uma densidade bem mais baixa que a usada para os outros experimentos, assim as células poderiam movimentar-se na placa com menores chances de interagir fisicamente umas com as outras.

Após a geração dos vídeos de *time lapse*, pudemos rastrear a migração de células individualizadas com o auxílio do *plugin Cell Tracking* do *software ImageJ*. Para isso, acompanhamos aproximadamente 3 células/placa em 5 placas, com um total de, no mínimo, 15 células, e calculamos os parâmetros velocidade e direcionalidade. A velocidade era determinada pela distância que a célula havia percorrido dentro de um determinado período

de tempo, enquanto a direcionalidade representa o quanto a célula migrou em uma direção específica.

Como podemos ver nas figuras 31 e 32, o tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S parecem não induzir alterações estatisticamente significativas no padrão de migração direcional das células, apresentando até um sutil aumento na direcionalidade de células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com o composto RF-13S a 20 μM .

Já o parâmetro velocidade apresentou alterações relevantes após o tratamento com os compostos nas duas linhagens analisadas: para a linhagem SK-Mel-147 (figura 33). As concentrações de 10 μM tanto do composto RF-13R quanto do composto RF-13S não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; entretanto, as concentrações mais altas de ambos os compostos apresentaram diminuição expressiva na velocidade de migração.

Na linhagem SK-Mel-28 (figura 34), os efeitos são expressivos em todos os tratamentos, sendo que a concentração de 20 μM de ambos os compostos induz um comprometimento maior que a concentração mais baixa (10 μM); além disso, o composto RF-13S parece ser mais potente que o composto RF-13R no comprometimento da velocidade de migração das células da linhagem SK-Mel-28, o que vem ao encontro dos resultados obtidos nos outros experimentos.

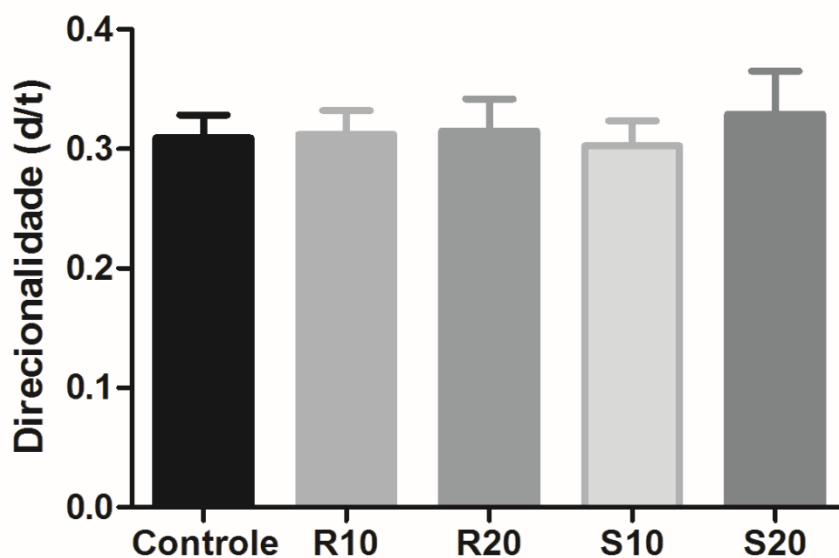


Figura 31 – Avaliação de direcionalidade de células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB. No controle, foi usado meio de cultura sem adição de compostos. Foram analisadas no mínimo três células por vídeo e o experimento foi realizado em triplicata. Somente células individualizadas que não tiveram contato físico com nenhuma outra célula foram consideradas para o acompanhamento. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Tuckey. Barras representam o desvio padrão.

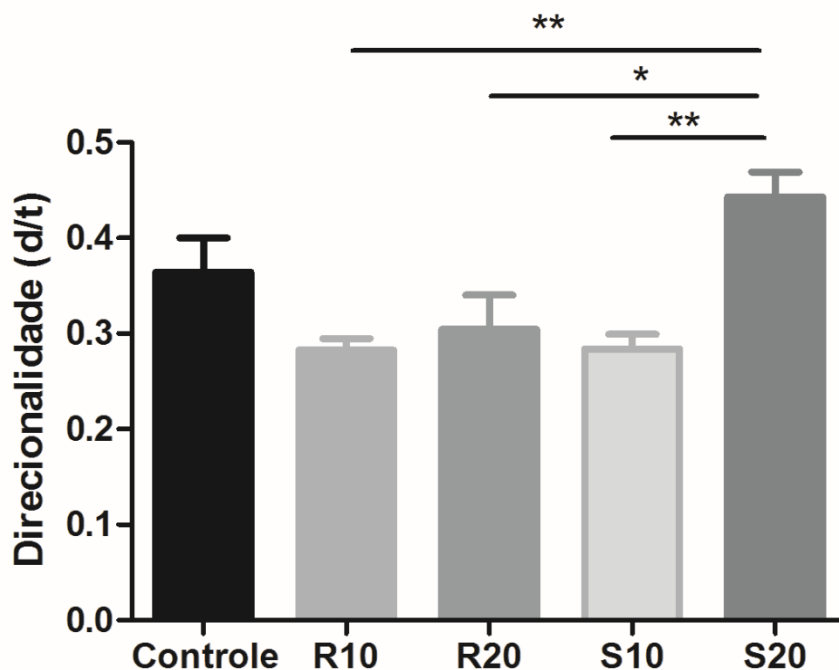


Figura 32 – Avaliação de direcionalidade de células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB. No controle, foi usado meio de cultura sem adição de compostos. Foram analisadas no mínimo três células por vídeo e o experimento foi realizado em triplicata. Somente células individualizadas que não tiveram contato físico com nenhuma outra célula foram consideradas para o acompanhamento. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Tuckey. Barras representam o desvio padrão. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$.

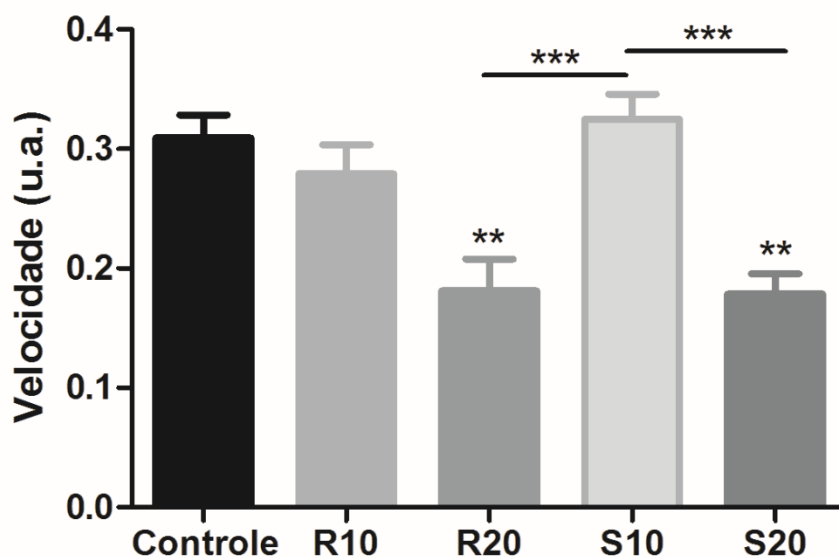


Figura 33 – Avaliação de velocidade de células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB. No controle, foi usado meio de cultura sem adição de compostos. Foram analisadas no mínimo três células por vídeo e o experimento foi realizado em triplicata. Somente células individualizadas que não tiveram contato físico com nenhuma outra célula foram consideradas para o acompanhamento. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Tuckey. Barras representam o desvio padrão. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

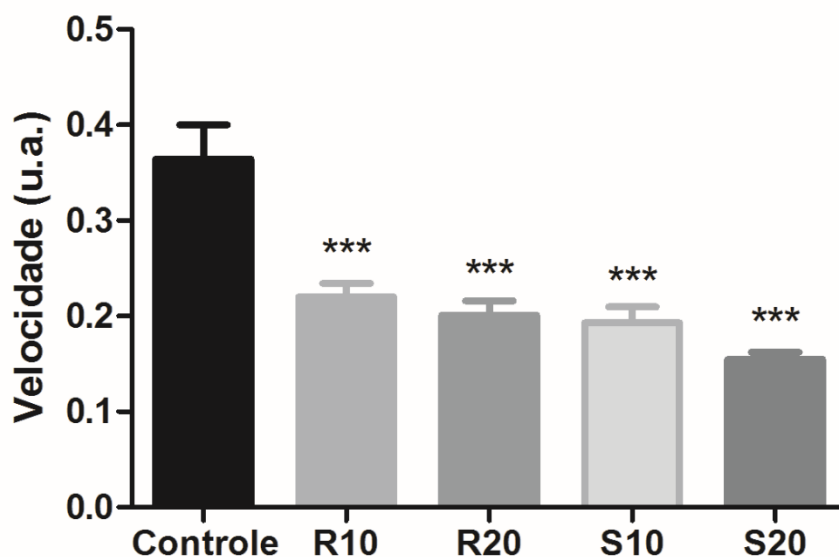


Figura 34 – Avaliação de velocidade de células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 10 μ M e 20 μ M em 1% de SFB. No controle, foi usado meio de cultura sem adição de compostos. Foram analisadas no mínimo três células por vídeo e o experimento foi realizado em triplicata. Somente células individualizadas que não tiveram contato físico com nenhuma outra célula foram consideradas para o acompanhamento. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Tuckey. Barras representam o desvio padrão. ***: $p < 0,001$.

4.10 ENSAIO DE GENOTOXICIDADE

A fim de avaliar a capacidade dos compostos RF-13R e RF-13S em induzir efeitos genotóxicos, foram avaliadas as frequências das alterações nucleares (a) micronúcleo, (b) broto nuclear e (c) ponte nucleoplásmica (figura 35) nas linhagens HT-144, SK-Mel-28 e SK-Mel-147.

Cada uma destas alterações nucleares é oriunda de um diferente mecanismo: micronúcleos originam-se a partir de fragmentos de cromossomos acêntricos, fragmentos cromatídicos acêntricos e cromossomos inteiros, sendo marcadores de dano de DNA ou erros de segregação cromossômica. O broto nuclear assemelha-se morfológicamente ao micronúcleo, porém se apresenta ligado ao núcleo por uma haste de material nucleoplásmico, e representa um marcador de amplificação gênica. Finalmente, a ponte nucleoplásmica é oriunda de reparo de extremidades não-homólogas (NHEJ – *Non-Homologous End Joining*) ou da fusão de extremidades teloméricas, sendo marcadores de cromossomos dicêntricos, que são distendidos durante a separação dos cromossomos na mitose.

Para este ensaio, foram contadas 1000 células binucleadas por amostra e, dentre estas, foram avaliadas as alterações mencionadas acima, exemplificadas na figura 35.

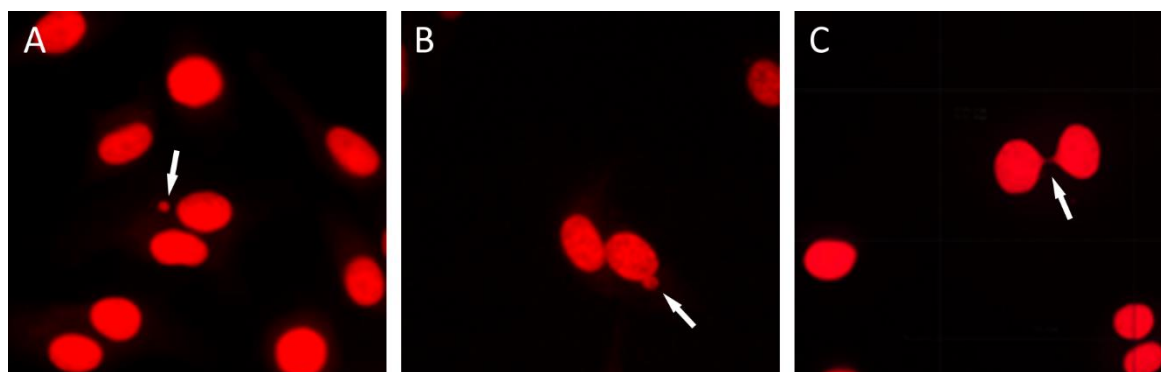


Figura 35 – Fotomicrografia das alterações nucleares analisadas, indicadas pelas setas. A: micronúcleo; B: broto nuclear; C: ponte nucleoplásmica. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência Nikon Optiphot2.

Os tratamentos foram realizados nas concentrações de 50 nM e 100 nM pois era necessária a contagem de 1000 células binucleadas, submetidas à ação do inibidor de mitose citocalasina B e dos compostos de telúrio. Uma vez que as concentrações de 10 μ M e 20 μ M não permitiram a obtenção dessa quantidade de células binucleadas, baixamos as concentrações de tratamento para a escala nanomolar.

A linhagem SK-Mel-147 não apresentou alteração significativa em nenhum dos parâmetros analisados tanto para o composto RF-13R (Figura 36) quanto para o composto RF-13S (Figura 37).

A linhagem SK-Mel-28 não apresentou alterações significativas nas frequências de brotos nucleares ou pontes nucleoplásmicas; entretanto, a frequência de micronúcleos foi aumentada após o tratamento com o composto RF-13R na concentração de 100 nM (Figura 38) e o composto RF-13S na concentração de 50 nM (Figura 39), ambos atingindo valores próximos ao controle positivo (doxorubicina 1.0 μ M), um indutor de alterações nucleares já bem estabelecido. Do mesmo modo que em experimentos anteriores, que avaliaram outros parâmetros, o composto RF-13S mostrou um potencial genotóxico maior que seu enantiômero, precisando de metade da concentração para induzir o mesmo efeito.

Já a linhagem HT-144 (figuras 40 e 41) não apresentou diferença na frequência de brotos nucleares e pontes nucleoplásmicas em nenhuma das condições de tratamento; além disso, estranhamente, a única alteração com significância estatística foi uma diminuição na frequência de micronúcleos após o tratamento com o composto RF-13R na concentração de 50 nM (figura 40), o que parece provir de um efeito reparador dos compostos de telúrio sobre estas células.

Comparando o efeito de cada concentração dos compostos RF-13R e RF-13S para cada linhagem na indução de micronúcleos (figura 42), podemos verificar que somente a linhagem SK-Mel-28 apresenta diferença significativa entre os compostos na indução de micronúcleos nas concentrações de 100 nM do composto RF-13R e 50 nM do composto RF-13S em relação à concentração de 100 nM do composto RF-13S.

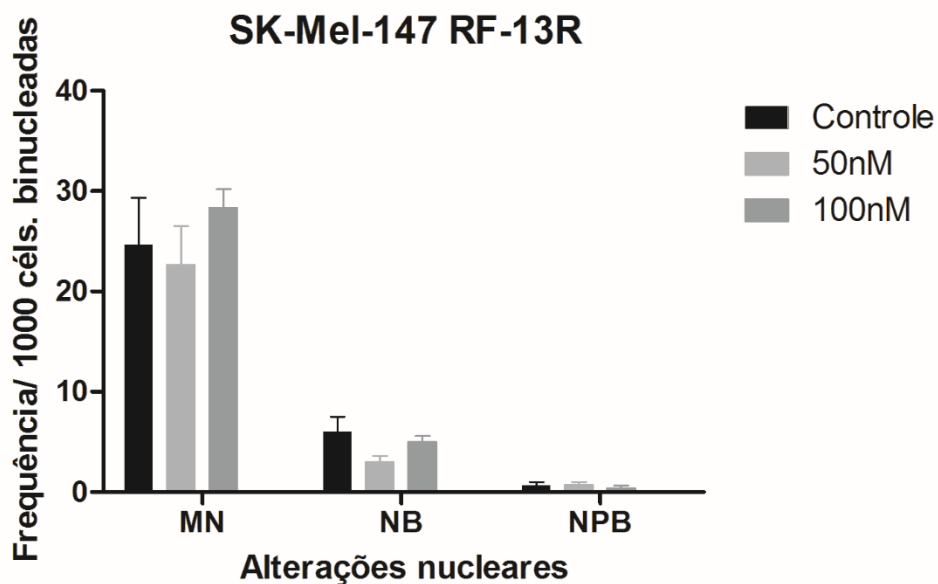


Figura 36 – Frequência de alterações nucleares em células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com o composto RF-13R nas concentrações de 50 nM e 100 nM. No controle foi usado meio de cultura sem adição de compostos. MN: Micronúcleo; NB: Broto nuclear; NPB: Ponte nucleoplásmica. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Barras representam erro padrão.

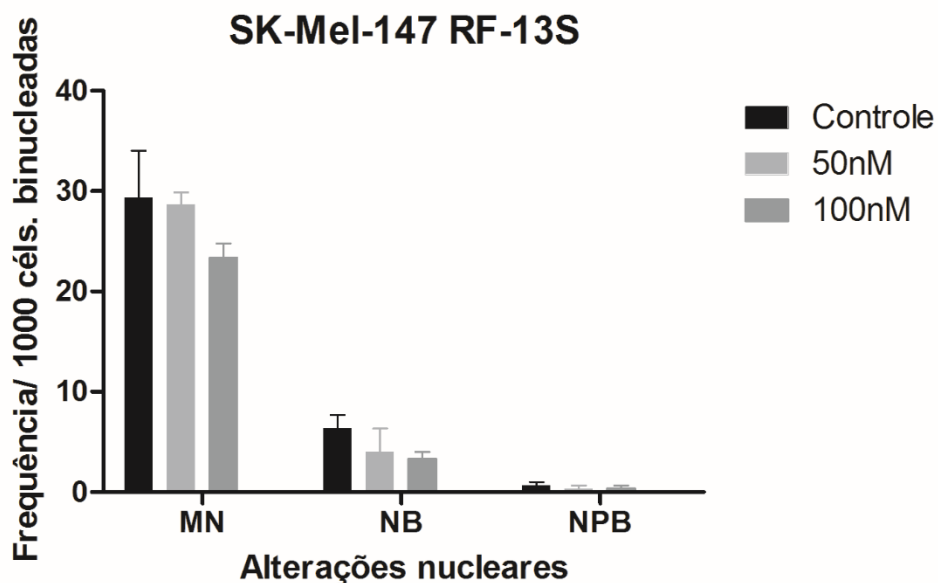


Figura 37 – Frequência de alterações nucleares em células da linhagem SK-Mel-147 tratadas com o composto RF-13S nas concentrações de 50 nM e 100 nM. No controle foi usado meio de cultura sem adição de compostos. MN: Micronúcleo; NB: Broto nuclear; NPB: Ponte nucleoplásmica. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Barras representam erro padrão.

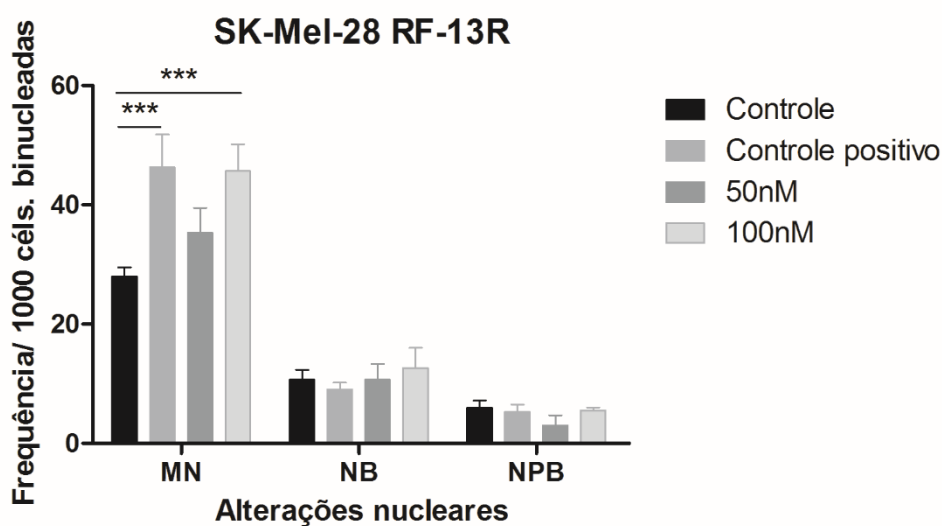


Figura 38 – Frequência de alterações nucleares em células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com o composto RF-13R nas concentrações de 50 nM e 100 nM. No controle foi usado meio de cultura sem adição de compostos. MN: Micronúcleo; NB: Broto nuclear; NPB: Ponte nucleoplásmica. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Barras representam erro padrão. ***: $p < 0,001$.

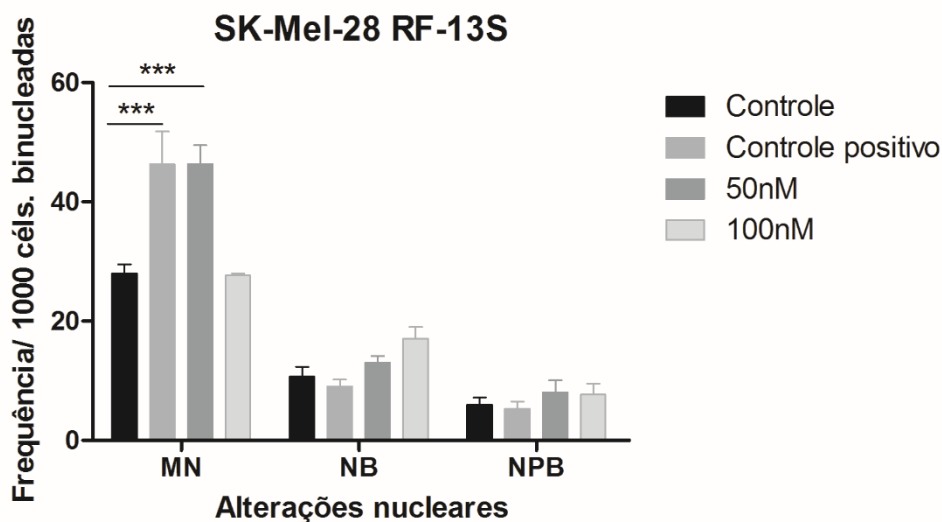


Figura 39 – Frequência de alterações nucleares em células da linhagem SK-Mel-28 tratadas com o composto RF-13S nas concentrações de 50 nM e 100 nM. No controle foi usado meio de cultura sem adição de compostos. MN: Micronúcleo; NB: Broto nuclear; NPB: Ponte nucleoplásmica. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Barras representam erro padrão. ***: $p < 0,001$.

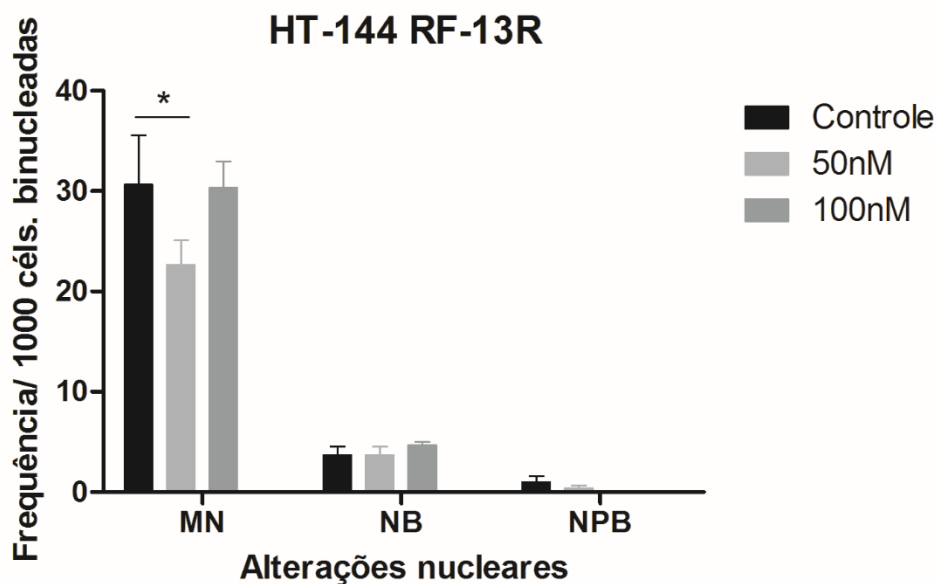


Figura 40 – Frequência de alterações nucleares em células da linhagem HT-144 tratadas com o composto RF-13R nas concentrações de 50 nM e 100 nM. No controle foi usado meio de cultura sem adição de compostos. MN: Micronúcleo; NB: Broto nuclear; NPB: Ponte nucleoplásmica. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Barras representam erro padrão. *: $p < 0,05$.

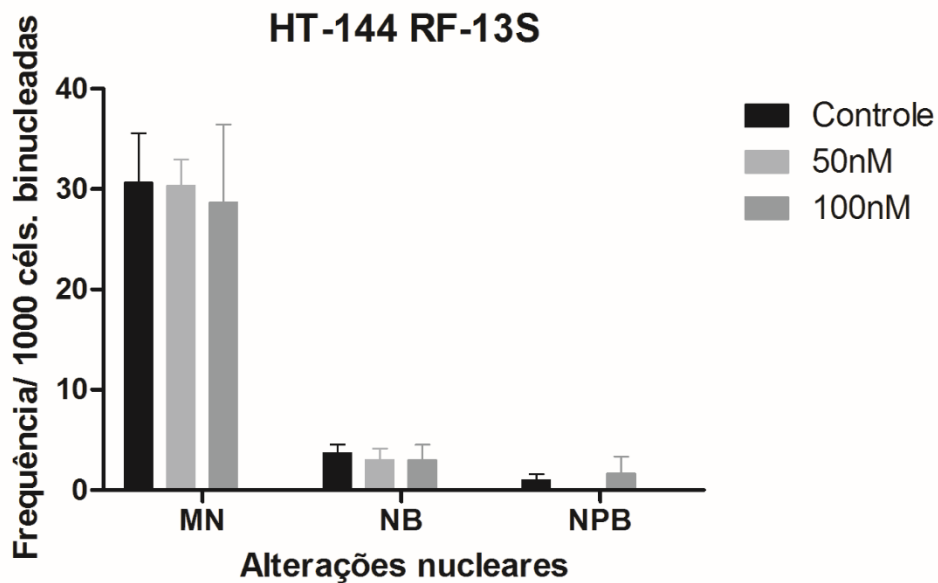


Figura 41 – Frequência de alterações nucleares em células da linhagem HT-144 tratadas com o composto RF-13S nas concentrações de 50 nM e 100 nM. No controle foi usado meio de cultura sem adição de compostos. MN: Micronúcleo; NB: Broto nuclear; NPB: Ponte nucleoplásmica. Foi realizada a análise One-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Barras representam erro padrão.

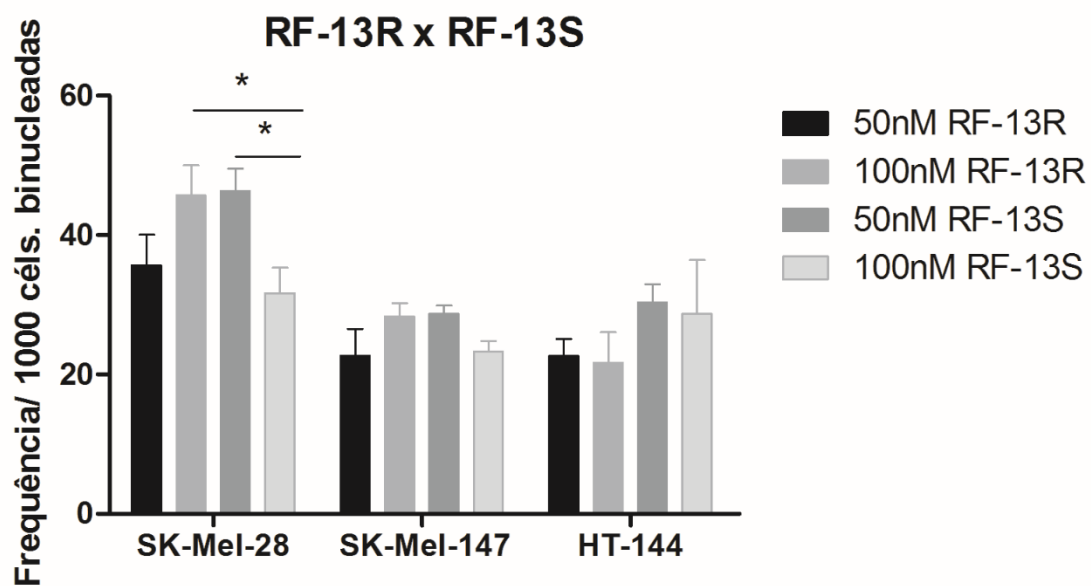


Figura 42 – Frequência de micronúcleos nas linhagens HT-144, SK-Mel-28 e SK-Mel-147 após tratamento com os compostos RF-13R e RF-13S nas concentrações de 50 nM e 100 nM. Barras representam erro padrão. *: $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS PRÉ-ANALÍTICOS

Neste trabalho, buscamos avaliar os efeitos dos compostos orgânicos de telúrio RF-13R e RF-13S sobre a biologia celular de melanomas metastáticos humanos. Estudos prévios, realizados em colaboração com nosso laboratório, mostraram efeitos citotóxicos destes compostos sobre linhagens celulares tumorais e não-tumorais de diferentes tecidos de origem, efeitos anti-angiogênicos *in vitro*, bem como inibição de desenvolvimento de tumores *in vivo* em camundongos desafiados com células de melanoma (Paschoalin T, Martens AA, Omori AT, Pereira FV, Juliano L, Travassos LR, Machado-Santelli GM, Cunha RLOR – manuscrito em preparação). Inicialmente, realizamos o ensaio de atividade hemolítica para verificar se estes compostos orgânicos de telúrio possuíam potencial de indução de lise de membrana celular, que mostrou efeitos positivos somente a concentrações altas (316 μM), o que nos deu confiança para seguir com as investigações em linhagens celulares usando concentrações abaixo desse limite.

A partir dos resultados encontrados pelo grupo da Dra. Paschoalin, em que os pesquisadores avaliaram o IC_{50} dos compostos em diferentes linhagens celulares murinas (B16F10-Nex2 e NIH-3T3) e humanas (HeLa, HT-144, Mewo, A2058, SK-Mel-28, SK-Mel-25 e HUVEC), estabelecemos um painel de linhagens de melanoma metastático humano, com diferentes perfis de mutação (vide Material e métodos), para avaliar os efeitos celulares dos enantiômeros de telúrio (RF-13R e RF-13S). Encontramos resultados de citotoxicidade para todas as linhagens tumorais, sendo que nossos resultados foram próximos aos encontrados pelos autores do estudo anterior para as linhagens coincidentes com as utilizadas neste trabalho (HT-144 e SK-Mel-28). Um resultado interessante foi que os compostos apresentaram efeitos citotóxicos somente nas linhagens tumorais, enquanto para a linhagem não-tumoral NGM não foi possível estabelecer o IC_{50} com a faixa de concentrações utilizada (100 nM a 1.0 mM), o que parece apontar para uma seletividade do composto em direção a células tumorais, poupando células saudáveis. Resultados similares de seletividade foram encontrados por Huang e colaboradores⁴² ao avaliar os efeitos de nanobastões de telúrio, em que os pesquisadores determinaram a citotoxicidade destas nanopartículas contra linhagens de diferentes cânceres (mama – MCF-7; pulmão – A549; fígado – HepG2; neuroblastoma – Neuro-2a; e melanoma – A375), porém encontraram poucos efeitos citotóxicos sobre a linhagem HK-2 de rim humano normal, o que mostra uma grande seletividade em direção a

células cancerosas, independente da origem tumoral. Da mesma maneira, um estudo com um composto orgânico de telúrio (DP41) mostrou que o tratamento de células de câncer de cólon (HCT 116) com esta droga induziu a geração de espécies reativas de oxigênio, causando estresse do retículo endoplasmático e culminando em apoptose; entretanto, o mesmo esquema de tratamento falhou em produzir resultados similares em células normais epiteliais de retina (ARP-19)⁶⁵, evidenciando os efeitos de seletividade em direção a células tumorais tanto para nanopartículas quanto para compostos orgânicos de telúrio.

Estes resultados de seletividade para células cancerosas têm potencial para representar um avanço estrondoso em especial para o tratamento de melanomas metastáticos, pois estes vêm em contramão aos avanços em quimioterapia, desenvolvendo resistência a todos os tratamentos utilizados na prática clínica, como o principal medicamento usado em quimioterapia alvo-dirigida (também chamada de terapia personalizada) para melanoma metastático, vemurafenib: este é um inibidor da isoforma mutante mais prevalente da serina-treonina quinase BRAF (BRAF^{V600E}) que, na conformação mutada, promove ativação constitutiva da via de sinalização MAPK/ERK⁶⁶. Mesmo o desenvolvimento de imunoterapias, que pareceu dar um novo fôlego às terapias anti-câncer, por enquanto apresentam pouco êxito com melanomas metastáticos quando usados em monoterapia⁶⁷, e estudos mostram desenvolvimento de hepatotoxicidade em pacientes tratados com uma combinação de vemurafenib e ipilimumab – anticorpo que libera as células imunes de inibição induzida pelo câncer –, causando encerramento prematuro dos estudos clínicos³².

Além disso, o alto grau de variabilidade genética do melanoma contribui para essas dificuldades, como, por exemplo, pacientes desenvolvendo subpopulações resistentes dentro de uma mesma metástase³⁰. Por essa razão, a prospecção e síntese de drogas e estudos mais aprofundados sobre os seus efeitos sobre diferentes linhagens de melanoma são muito interessantes, pois seria possível encontrar meios de contornar essas dificuldades que hoje limitam a eficácia do tratamento de pacientes com melanoma.

5.2 MORFOLOGIA

Além das evidências de seletividade para células tumorais pelos compostos RF-13R e RF-13S verificadas no ensaio de citotoxicidade, os resultados de imunofluorescência – realizada para todas as linhagens celulares avaliadas neste estudo – também apontaram nessa direção, pois em todas as linhagens tumorais analisadas, encontramos alterações expressivas no citoesqueleto de actina e tubulina, com perda da morfologia característica de cada linhagem, além da perda de volume citoplasmático e formação de *blebs* de membrana, enquanto a linhagem não-tumoral NGM apresentou poucas alterações morfológicas após o tratamento com os compostos.

Estudos feitos com linhagens celulares de cólon transformadas (HT-29 e Caco-2) e não-transformada (CCD-18Co) também mostraram efeitos de comprometimento de morfologia após o tratamento com os compostos difenil ditelureto (DPDT) e tetracloreto de telúrio (TeCl₄), porém a linhagem não-tumoral exibiu efeitos muito mais brandos quando comparados com as linhagens transformadas, tanto para morfologia quanto para citotoxicidade⁵⁴. Apesar de os autores relatarem o arredondamento e vacuolização das células, as imagens apresentadas por eles podem levar a uma interpretação errônea devido ao grau de confluência da cultura no momento de aquisição das imagens; as imagens dos tratamentos em concentrações mais altas (em que houve mais morte celular e desprendimento de células da superfície de cultura) mostram, para as linhagens tumorais, a formação de *blebs* de membrana similares às que encontramos em nosso trabalho.

Do mesmo modo que encontrado por Vij e Hardej⁵⁴, para a linhagem não-tumoral NGM, as alterações de citoesqueleto foram muito menos expressivas, com um leve alongamento das células tratadas que, entretanto, ainda apresentavam fibras de estresse e se mantinham aderidas ao substrato após o período de tratamento, sem sinais de morte celular. Estes resultados estão em concordância com estudos publicados que mostram perda de morfologia característica de células de câncer de cólon (HCT116) após tratamento com um composto orgânico de telúrio (DP41), com desarranjo do citoesqueleto de tubulina e perda de adesões celulares na periferia das células – efeitos muito similares aos causados pelo controle positivo Taxol⁶⁵. Além disso, Roy e Hardej⁵³ mostraram resultados de microscopia eletrônica de varredura em que astrócitos de ratos em cultura tratados com um composto de telúrio

orgânico (DPDT) e um inorgânico (TeCl_4) apresentavam perda de morfologia característica, com arredondamento e compactação celular; entretanto, o mais interessante foi verificar que as concentrações mais altas de tratamento com os compostos mostravam claramente a presença de *blebs* de membrana⁵³ similares ao que encontramos neste trabalho para os tratamentos com os enantiômeros nas diferentes linhagens tumorais de melanoma.

A fim de validar os resultados de alteração de morfologia das células tratadas, realizamos a análise de circularidade por citometria de fluxo, em que a morfologia da célula em suspensão foi usada como parâmetro para a avaliação de desarranjos no citoesqueleto das células tratadas, somente para a linhagem SK-Mel-147 – uma vez que todas as linhagens tumorais analisadas apresentaram alterações morfológicas similares. Do mesmo modo que estudos de ativação de monócitos, em que estes sofrem um rearranjo de citoesqueleto que pode ser avaliado em citometria de fluxo com aquisição de imagem⁶⁸, decidimos avaliar o grau de circularidade das amostras após tripsinização, assumindo que os *blebs* de membrana se manteriam inalterados durante os processos de tripsinização, fixação e sucessivas lavagens. Isso se confirmou nos resultados, em que o tratamento com os compostos levou a um deslocamento do pico de células da população de alta circularidade (células normais arredondadas) para a população de baixa circularidade (células com alterações morfológicas) no tratamento com o composto RF-13R na concentração de $20\mu\text{M}$ e com o composto RF-13S nas concentrações de $10\mu\text{M}$ e $20\mu\text{M}$. Além de análises de ativação de monócitos, ensaios de citometria de fluxo com aquisição de imagens também são usados para diferenciação de tipos celulares dentro de uma amostra, como no caso de células tumorais circulantes⁶⁹, o que torna o método confiável para análises de alteração de morfologia de células em suspensão.

5.3 PROCESSOS CELULARES

A fim de verificar os efeitos dos compostos de telúrio sobre os processos celulares, realizamos os ensaios de avaliação de ciclo celular e morte celular por ativação de caspase 9. Embora os efeitos encontrados nas análises morfológicas fossem muito congruentes entre os dois compostos, nos ensaios de ciclo celular, tivemos diferenças de resposta entre as linhagens celulares, que apresentaram duas situações: (a) acúmulo de população G2/M para as

linhagens SK-Mel-19 e HT-144 e (b) aumento de população G1 para as linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147.

Uma vez que o *checkpoint* do ciclo celular na fase G2/M é responsável pela manutenção da estabilidade genômica e pela verificação de qualquer dano de DNA antes do início da mitose⁷⁰, um expressivo número de drogas leva ao bloqueio nessa fase do ciclo celular, tanto em células normais quanto em células tumorais. O composto mais estudado de telúrio (AS101) é um desses: um estudo que avaliou os efeitos deste composto sobre diferentes linhagens celulares de mieloma múltiplo mostrou um aumento na porcentagem de células em G2/M de aproximadamente 23% no controle para até 38% nos tratamentos, de uma maneira concentração-dependente⁷¹, com resultados similares em outras linhagens. Análises de proteínas envolvidas com o bloqueio em G2/M mostraram um aumento nos níveis da proteína p21^{Waf1}, inibidora de CDK1 (proteína essencial para a entrada em mitose), e diminuição na expressão de survivina, que também está envolvida com a regulação do ciclo celular. Estudos mais recentes do grupo com o mesmo composto e a mesma linhagem celular mostraram também que o tratamento com AS101 induziu um aumento na expressão de p53 – tanto citoplasmática quanto nuclear –⁷² que, quando translocada para o núcleo, leva a um bloqueio na fase G2/M do ciclo celular e apoptose. Uma vez que ambas as linhagens que sofreram acúmulo de população na fase G2/M em nossos estudos (HT-144 e SK-Mel-19) apresentam p53^{wt}, acreditamos que os compostos RF-13R e RF-13S atuem de maneiras similares ao composto AS101, com provável aumento de expressão de p53 e envolvimento da via de sinalização Akt. O efeito de parada em G2/M também foi encontrado para células de câncer de cólon submetidas ao tratamento com um composto orgânico de telúrio⁶⁵, o que mostra que os efeitos provavelmente são diretamente causados pelo átomo de telúrio nas moléculas, independentemente dos radicais adicionados.

Embora muito menos comum que o bloqueio em G2/M, duas das quatro linhagens tumorais avaliadas apresentaram acúmulo de população em G1. Estudos avaliando os efeitos de pseudopeptídeos contendo telúrio na linhagem de câncer de mama MCF-7 mostraram efeitos de parada no ciclo celular na fase G1, passando de 68% no controle para até 91,6% de população em G1 após o tratamento com um dos compostos⁷³, similares aos resultados encontrados em nosso trabalho para as linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-147. Os pesquisadores acreditam que esses efeitos sobre ciclo celular encontrados na linhagem MCF-7 sejam

decorrentes do comprometimento da estrutura do retículo endoplasmático e desarranjo do citoesqueleto de actina que, além de causar a parada no ciclo, ainda levaram a indução de apoptose; entretanto, o grupo não determinou vias moleculares ou proteínas específicas comprometidas neste processo. Uma das proteínas que poderia estar envolvida nesse bloqueio em G1 é a tioredoxina (Trx): além de ser um importante participante da regulação redox na célula, a tioredoxina reduzida é uma fonte doadora de hidrogênios para a enzima ribonucleotídeo redutase, fundamental para a síntese de DNA, e sua ausência leva ao bloqueio na fase G1 do ciclo celular através da redução na expressão de ciclina D1, sem indução de morte celular⁷⁴. Estudos com diorganil teluretos mostraram que diferentes compostos de telúrio inibiam a atividade de tioredoxinas e tioredoxina redutases⁷⁵, o que pode justificar esses bloqueios em G1 que encontramos para as linhagens em nosso trabalho.

Morfologicamente, o processo de apoptose apresenta inicialmente alterações como encolhimento da célula, compactação de cromatina, e – em um estágio mais avançado – formação de *blebs* de membrana plasmática e fragmentação do núcleo, formando vesículas com porções de citoplasma e material genético, chamadas corpos apoptóticos⁷⁶. A grande quantidade de células em suspensão encontradas no preparo dos diferentes experimentos do presente trabalho, além da perda de adesão celular e de morfologia característica evidenciados nos ensaios de imunofluorescência e microscopia em tempo real, nos levaram a acreditar que um processo massivo de morte celular estava sendo desencadeado pelo tratamento com as organoteluranas.

Diferentes compostos orgânicos de telúrio apresentam indução de apoptose: DP41⁶⁵, RT-04⁷⁷, entre outros. Entretanto, a análise de perfil de morte celular causada por compostos de telúrio é muito variável. Um mesmo grupo de pesquisa encontrou duas situações opostas em uma avaliação dos efeitos de um composto orgânico de telúrio (DPDT) e um inorgânico (TeCl_4): em um estudo, TeCl_4 induzia apoptose em astrócitos de ratos, enquanto DPDT parecia induzir oncoses⁵³; já em outro estudo subsequente, realizado em linhagem celular de câncer de cólon, DPDT induzia apoptose e TeCl_4 induzia necrose⁵⁴.

Do mesmo modo que para os compostos de telúrio, podemos verificar diferenças entre os mecanismos de morte celular causadas por nanoestruturas de telúrio: nanobastões de telúrio induzem apoptose, evidenciada em imunofluorescência mostrando compactação nuclear e

marcação de DNA fragmentado em ensaio de TUNEL, bem como a ativação de caspase 9⁴²; enquanto nanoredes de telúrio parecem induzir morte celular por necrose, com rompimento de membrana plasmática, lesão mitocondrial, núcleo inchado e desaparecimento de outras organelas – visualizado por microscopia eletrônica de transmissão⁴⁰.

Uma das características mais marcantes encontradas em nosso trabalho foi a súbita perda de volume citoplasmático de algumas células tratadas com os compostos de telúrio, similar ao encontrado por Beauvais e colaboradores⁷⁸, seguida da formação de *blebs*, o que nos fez acreditar que um processo de morte celular apoptótica muito pronunciado estava ocorrendo em resposta ao tratamento com os compostos de telúrio.

Apesar das evidências morfológicas – perda de morfologia típica, perda de volume citoplasmático, e formação de *blebs* de membrana; todos indicativos de apoptose – verificadas nos ensaios anteriores de nosso trabalho, a maior parte das linhagens celulares não apresentou ativação de caspase 9 (uma molécula intermediária da via intrínseca de apoptose) em tratamentos com o IC₅₀ dos compostos, exceto a linhagem SK-Mel-19, que apresentou indução de apoptose em 91% da população tratada com o composto RF-13R a 20 µM. A linhagem SK-Mel-28 apresentou indução de apoptose na concentração de 20 µM de ambos os compostos (75% para o composto RF-13R e 44% para o composto RF-13S), entretanto essa concentração representa mais que o dobro do IC₅₀ para esta linhagem.

Em oposição aos trabalhos que encontramos na literatura, que avaliaram outras moléculas de diferentes pontos da cascata de ativação de apoptose, como Du e colaboradores⁶⁵, que avaliaram anexina, expressão de Bcl-2, liberação de citocromo c mitocondrial, ativação de caspase, clivagem de PARP, encontramos características morfológicas de apoptose mas somente avaliamos molecularmente um dos intermediários do processo apoptótico (caspase 9), portanto não podemos dizer categoricamente que não há apoptose. Ainda assim, há também a possibilidade da ocorrência de outros processos de morte celular que não sejam apoptose, similar aos resultados encontrados por outros grupos que estudam os efeitos biológicos de compostos de telúrio, como oncose⁵³ ou necrose⁵⁴.

5.4 ANÁLISES MORFOLÓGICAS – MICROSCOPIA EM TEMPO REAL

Os resultados do ensaio de imunofluorescência, apesar de ilustrar claramente os efeitos sobre a morfologia das células tratadas com os compostos de telúrio, representam um ponto fixo dentro de todo um processo de perturbação celular. Para esclarecer temporalmente os eventos que ocorrem durante o período de tratamento com os compostos, realizamos o ensaio de microscopia em tempo real, que nos permitiu determinar o momento em que têm início as alterações morfológicas encontradas, além da progressão dos eventos, desde o início da perda de adesões celulares, passando pelo arredondamento das células e formação de *blebs* até a completa imobilização das células. Para isso, analisamos a progressão dos efeitos dos compostos sobre as linhagens tumorais SK-Mel-147 e SK-Mel-28, devido à diferença na carga de mutações que cada uma carrega – o que poderia ser responsável por diferentes respostas frente o estímulo do tratamento.

Neste ensaio, em que acompanhamos as células tratadas durante o período de 65 horas, pudemos verificar diferenças no tempo em que os compostos começam a causar efeitos de alteração de morfologia entre as duas linhagens, sendo que a linhagem SK-Mel-147 (que, dentre os genes que nós avaliamos, só apresenta a mutação em NRAS) só começou a apresentar perda de adesão e alteração de morfologia após o tempo de 13 horas, enquanto a linhagem SK-Mel-28 (com mutações em BRAF, PTEN e p53) começou a apresentar essas alterações em menos da metade do tempo – 6 horas. Esta diferença de tempo pode estar relacionada ao grau de estresse oxidativo que as células apresentam: uma célula com mais mutações possivelmente está associada a um maior desbalanço em seu sistema redox, quando comparada com células com menos mutações ou células normais. O sistema redox de células normais se apresenta em condições estáveis e, por isso, está muito mais propenso a suportar a produção de níveis mais altos de espécies reativas de oxigênio; entretanto, células tumorais, com mutações e instabilidade genética, já apresentam um aumento constitutivo de espécies reativas de oxigênio que, combinado à diminuição de antioxidantes como a glutathiona (GSH/GSSG), pode levar a célula a um estado irreversível de estresse oxidativo, a partir do qual a morte celular é inevitável⁷⁹. Já foi mostrado que compostos de telúrio reagem com radicais tiol (-SH) e podem atuar como miméticos de glutathiona peroxidase, enzima que reduz espécies reativas de oxigênio, aliviando o estresse oxidativo³⁹; entretanto, há estudos que propõem o desenvolvimento e aplicação de drogas contendo

telúrio e selênio que apresentariam citotoxicidade seletiva (chamadas moléculas sensoras/efetoras): células normais expostas a estes compostos sofreriam efeitos antioxidantes, enquanto células tumorais sob estresse oxidativo entrariam em apoptose^{56,80}. Além disso, caso haja depleção de glutathiona – causada pelo próprio estresse oxidativo – no interior das células tumorais, a presença de miméticos de glutathiona peroxidase (compostos de telúrio) não serviria de nada para aliviar o estresse oxidativo presente na célula.

Apesar de apresentar alterações morfológicas em um tempo mais curto, as células da linhagem SK-Mel-28 sofreram efeitos menos graves do que a linhagem SK-Mel-147, com uma proporção menor de células desenvolvendo *blebs* e perdendo a adesão celular. Isto poderia estar relacionado a mecanismos de compensação ou resistência que a linhagem SK-Mel-28 – que tem uma carga de mutação maior, inclusive em p53 – tenha desenvolvido em uma subpopulação, levando uma porção menor da população a sofrer os efeitos do tratamento com os compostos, similar ao que ocorre nas respostas às terapias personalizadas no tratamento de melanoma⁸¹.

Além dos aspectos de perda de morfologia característica e formação de *blebs*, dois eventos parecem relevantes: (1) a linhagem SK-Mel-28 apresentava células que, durante a migração, não desfaziam as adesões na parte posterior da célula e entravam em colapso, o que pode estar relacionado a hiperestabilização de citoesqueleto e aumento do estresse celular ou senescência; e, (2) em ambas as linhagens, observamos que células multinucleadas e com grande volume citoplasmático eram as primeiras a entrar em colapso, o que pode estar associado com a capacidade de o composto induzir um estado de estresse oxidativo que leve as células a entrarem em morte celular – uma vez que estas células apresentam maior instabilidade genômica, elas são as primeiras a sofrer os efeitos deletérios dos compostos. Entretanto, a proporção de células com estas características era muito pequena, não sendo o suficiente para causar qualquer tipo de perturbação nos resultados de viabilidade.

Buscamos avaliar também a capacidade migratória dessas duas linhagens celulares. Para isso, realizamos os ensaios de fechamento de ferida, migração em *transwell* e avaliação de direcionalidade e velocidade por microscopia em tempo real. Todos os trabalhos que encontramos na literatura que avaliam os efeitos biológicos de compostos de telúrio focavam em citotoxicidade, alterações em estado redox e morte celular, sem se preocupar com o

parâmetro de migração celular, pois estes compostos compreendem miméticos de glutathione peroxidase^{39,82} e os efeitos imediatos são perda de morfologia e morte celular^{40,42,53,54,65,73,83}. Entretanto, encontramos comprometimentos sub-letais usando concentrações de IC₅₀/2 e buscamos avaliar o comprometimento dessas concentrações mais baixas sobre o processo de migração celular, de fundamental importância para o processo de invasão e metástase do câncer.

A largura padronizada dos intervalos nas monocamadas celulares no ensaio de fechamento de ferida nos garantiu um ponto de partida igual para as diferentes condições de tratamento. Os parâmetros (a) densidade, (b) confluência e (c) largura da ferida foram medidos em tempo real para todas as condições de tratamento; e os resultados dos controles positivo e negativo não apresentaram diferenças expressivas entre si. A habilidade de células tumorais de proliferar normalmente na ausência de suplementação com SFB já tem sido documentada há um bom tempo^{84,85}, portanto não estranhamos os resultados encontrados para ambos os controles. Já para os tratamentos, podemos encontrar mais evidências da diferença de potência entre os dois compostos: tanto para a linhagem SK-Mel-28 quanto para a linhagem SK-Mel-147, a concentração de 10 µM do composto RF-13S diminuiu a migração das células na mesma proporção que a concentração de 20 µM do seu enantiômero. Ademais, a concentração de 20 µM do composto RF-13S, além de impedir a migração das células para o fechamento da ferida, comprometeu tão intensamente as células da linhagem SK-Mel-147 que causou um aumento da largura da ferida acima da largura de partida do experimento, atingindo quase o dobro da largura da ferida no início do experimento. Isto está em conformidade com os resultados encontrados nos ensaios de imunofluorescência, em que encontramos comprometimento do citoesqueleto de actina em todas as linhagens, e microscopia em tempo real, em que verificamos a perda de adesão celular das linhagens e também a diferença de eficiência dos compostos em induzir comprometimentos morfológicos entre as linhagens celulares SK-Mel-147 e SK-Mel-28.

Para o ensaio de migração em *transwell* também encontramos uma diferença de potência entre os compostos RF-13R e RF-13S, sendo que o último apresenta efeitos mais graves e induz comprometimento de migração de maneira concentração-dependente. Entretanto, para a linhagem SK-Mel-28, a concentração de 20 µM do composto RF-13R não induziu diminuição significativa na migração celular em relação ao controle positivo, do mesmo modo

que ambas as concentrações para o composto RF-13R e a concentração de 10 μ M para o composto RF-13S. Isto pode ser decorrente do fato de termos começado a aquisição de imagens imediatamente após a exposição das células aos compostos; no experimento de microscopia em tempo real, em que pudemos analisar o comportamento das células de ambas as linhagens pelo período de 65 horas, constatamos que as alterações morfológicas expressivas passavam a ocorrer após 13 horas de exposição aos compostos, mais da metade do tempo de análise para o ensaio de migração em *transwell*. Ou seja, durante este período inicial de 13 horas, as células ainda não haviam sofrido efeitos graves em seu citoesqueleto e sua capacidade de migração, podendo migrar facilmente através da membrana de policarbonato para a face inferior da membrana, aumentando a contagem de células que haviam migrado e não refletindo os efeitos de comprometimento de citoesqueleto na capacidade migratória.

Embora não tenhamos encontrado diferenças significativas para o parâmetro direcionalidade, encontramos efeitos de diminuição de velocidade de migração nas linhagens SK-Mel-147 e SK-Mel-28 após exposição aos compostos RF-13R e RF-13S, sendo que para a linhagem SK-Mel-28, todas as concentrações de ambos os compostos induziram diminuição da capacidade migratória das células de maneira concentração-dependente.

Estranhamente, para a linhagem SK-Mel-147, as concentrações mais baixas de ambos os compostos não induziram diminuição da velocidade de migração (apresentando até um aumento após o tratamento com 10 μ M do composto RF-13S). Este resultado vem contra os resultados encontrados até então que comparavam os efeitos dos compostos sobre estas duas linhagens: para os ensaios de microscopia em tempo real, fechamento de ferida e migração em *transwell* a linhagem SK-Mel-147 sofria efeitos mais graves que a linhagem SK-Mel-28.

5.5 GENOTOXICIDADE

Até a presente data, não encontramos nenhum trabalho na literatura que avaliasse o potencial genotóxico de compostos de telúrio em células eucariontes, portanto realizamos o ensaio CBMN (*Cytokinesis-block micronucleus assay*), que avalia a formação de estruturas

nucleares atípicas após o tratamento das células sob bloqueio da citocinese. Os enantiômeros RF-13R e RF-13S parecem não induzir amplificação gênica nem a formação de cromossomos dicêntricos nas linhagens de melanoma metastático estudadas, uma vez que não houve diferença significativa na frequência de broto nuclear e ponte nucleoplásmica – marcadores de cada um desses processos, respectivamente – em qualquer dos tratamentos nas três linhagens analisadas (HT-144, SK-Mel-147 e SK-Mel-28).

Contudo, os dois compostos manifestaram efeito genotóxico sobre a linhagem SK-Mel-28, induzindo resposta semelhante ao composto doxorrubicina – controle positivo cuja genotoxicidade já é conhecida. Os compostos de telúrio parecem induzir a quebra cromossômica ou perda de cromossomos inteiros da placa metafásica, uma vez que foi evidenciado o aumento da frequência de micronúcleos nos tratamentos com os compostos RF-13R e RF-13S. Entretanto, este efeito genotóxico não foi verificado nas linhagens HT-144 e SK-Mel-147; pelo contrário: no tratamento pode-se verificar, na concentração de 50 nM de RF-13R para as duas linhagens, um efeito “reparador”, uma vez que se observa redução da frequência de micronúcleos nestas linhagens, mas somente na HT-144 essa alteração se mostra significativa. Esta diferença na resposta das linhagens aos enantiômeros pode ser decorrente do seu *status* de p53, pois a SK-Mel-28 – a única linhagem, dentre as analisadas, em que os compostos manifestaram genotoxicidade – apresenta mutação em p53, enquanto as demais linhagens são selvagens para esta proteína (como mostrado na Tabela 1).

O parâmetro controle positivo – tratamento com doxorrubicina – não foi avaliado em todas as linhagens, pois as linhagens HT-144 e SK-Mel-147 apresentaram baixa quantidade de células binucleadas após o tratamento em combinação de doxorrubicina e citocalasina B (figura A1 – anexo), o que inviabilizou a sua análise; pode-se assumir que a exposição concomitante às duas drogas inibe a proliferação e/ou induz morte celular nestas linhagens. Também foi possível notar neste ensaio mais uma vez a diferença na potência entre as organoteluranas na linhagem SK-Mel-28, em que foi necessário o dobro da concentração de RF-13R, em relação a RF-13S, para alcançar aproximadamente a mesma frequência de micronúcleos (MN). Esta relação também foi constatada na capacidade de inibição das catepsinas B e K pelas organoteluranas, em que se verificou que o composto RF-13S é mais potente em relação ao seu enantiômero (Rodrigo Cunha, comunicação pessoal).

A capacidade diferencial na indução de micronúcleos também foi verificada nesta linhagem no tratamento na ausência de citocalasina-B (dados não mostrados). Outro resultado comum entre os tratamentos na presença e ausência de citocalasina-B foi a insensibilidade da linhagem SK-Mel-147 aos tratamentos com o composto de telúrio RF-13R; Fenech⁸⁶ discute a respeito da comparação dos resultados obtidos no ensaio de micronúcleo com e sem bloqueio de citocinese, pois alguns estudos sugerem que, se a linhagem tem uma boa taxa de crescimento, ótimas condições de cultura e de divisões nucleares, é possível obter resultados comparáveis entre os dois ensaios quando são testados eventos clastogênicos. Porém, na linhagem HT-144 os tratamentos com os dois compostos na ausência do inibidor de citocinese promoveram indução significativa de micronúcleos ($p < 0,01$), enquanto no ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese não houve significância ou inibição da formação de micronúcleos. Esta diferença pode decorrer de falsos positivos, em que podem ter sido mensuradas alterações em células que não proliferaram durante o tempo de exposição aos compostos de telúrio.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da biologia de compostos de telúrio está em plena expansão, com o desenvolvimento de novos compostos por diferentes grupos de pesquisa mostrando resultados promissores^{42,54,65,72,73,83}, entretanto os compostos inorgânicos de telúrio levam a dianteira em questão de progressos, já tendo sido testados em humanos^{47,87}, enquanto não há relatos na literatura de testes de compostos orgânicos de telúrio em humanos.

Entretanto, sob a perspectiva de solubilidade e estabilidade, os compostos inorgânicos, como o composto mais estudado AS101, são pouco solúveis em soluções salinas, sendo rapidamente hidrolisados em TeOCl_3 ^[88], do mesmo modo que o composto TeCl_4 (Princival et al.⁸⁹ – Artigo submetido para publicação). Já os compostos orgânicos de telúrio apresentam a vantagem de serem mais estáveis e resistentes a hidrólise, mantendo sua integridade molecular mesmo após exposição a temperaturas de 60 a 70 °C⁹⁰. Além disso, dentro da família dos organocalcogênios, os compostos orgânicos de selênio mostraram sinais de decomposição a temperaturas de 37 °C⁹⁰, o que os torna inviáveis para aplicação terapêutica.

Outro aspecto relevante para o estudo dos compostos RF-13R e RF-13S é a questão da isomeria óptica. Aproximadamente metade das drogas atuais apresenta quiralidade, sendo que quase 90% delas são vendidas como soluções racêmicas contendo uma mistura equimolar dos dois enantiômeros⁹¹. As drogas podem apresentar diferenças farmacodinâmicas e farmacocinéticas entre as duas formas enantioméricas, como diferença de atividade, absorção, especificidade, entre outras⁹². Em situações extremas, como a tragédia da talidomida de 1961, os efeitos podem ser catastróficos: a talidomida era uma droga usada para o tratamento de náusea em mulheres grávidas, entretanto o tratamento resultou em defeitos congênitos em milhares de crianças⁹³. Posteriormente, descobriu-se que a talidomida é uma solução racêmica – o enantiômero R apresentava os efeitos farmacológicos desejados, entretanto o enantiômero S apresentava efeitos teratogênicos⁹⁴.

Embora não tenhamos encontrado efeitos antagônicos entre os enantiômeros estudados no presente trabalho, pudemos verificar uma diferença em atividade entre os compostos RF-13R e RF-13S, em que o último induzia alterações celulares e genotoxicidade a uma concentração menor que seu enantiômero. Esses resultados permitem que, no futuro, usemos uma solução enantiomérica do composto RF-13S (e não uma solução racêmica) para experimentos em animais e testes clínicos.

Além disso, alguns compostos miméticos de peroxidase (como os compostos de telúrio) têm mostrado seletividade em direção a células tumorais, poupando células saudáveis. Acredita-se que essa seletividade seja derivada de um efeito sensor efetor: a atividade *peroxidase-like* depende da concentração e da natureza dos tióis presentes na célula; ou seja, os compostos agem como antioxidantes enquanto há tióis consumíveis dentro da célula e se tornam letais na ausência deles⁹⁵. Essa atividade seletiva é completamente diferente da atividade dos compostos atualmente usados em quimioterapia, que são drogas continuamente ativas ou “disparadas” que, uma vez ativadas, permanecem continuamente ativas⁹⁶; isso confere uma vantagem muito grande para esses compostos miméticos de glutathione peroxidase, pois seu uso apresentaria teoricamente efeitos colaterais muito mais brandos, tornando-os prósperos objetos de estudo para terapias anticâncer.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Stewart BW, Wild CP, editors. World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2014. 630 p.
2. Randolph-Quinney PS, Williams SA, Steyn M, Meyer MR, Smilg JS, Churchill SE, Odes EJ, Augustine T, Tafforeau P, Berger LR. Osteogenic tumour in Australopithecus sediba: earliest hominin evidence for neoplastic disease. *S Afr J Sci.* 2016;112(7/8):1-7.
3. Breasted JH. The Edwin Smith surgical papyrus. Chicago, USA: The university of Chicago press, 1980. v. 1. 108 p.
4. Mukherjee S. The emperor of all maladies: a biography of cancer. New York, USA: Scribner Book Company. Edição reprint. 2011. 573 p.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. New York, USA: Garland Science. 5ed. 2007. 1268 p.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000;100:57-70.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011;144:646-74.
8. Breitbart EW, Greinert R, Volkmer B. Effectiveness of information campaigns. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92(1):167-72.
9. Fabbrocini G, Triassi M, Mauriello MC, Torre G, Annunziata MC, De Vita V, Pastore F, D'Arco V, Monfrecola G. Epidemiology of skin cancer: role of some environmental factors. *Cancers*, 2010;2:1980-9.
10. American Cancer Society. Cancer facts & figures 2015. Atlanta, USA: American Cancer Society, 2015. 56 p.
11. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984; 15(12):1147-65.
12. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Eng J Med.* 2006;355(1):51-65.
13. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Cimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27(36):6199-206.
14. Boland GM, Gershenwald JE. Principles of melanoma staging. In: Kaufman HL, Mehnert JM (editors). Melanoma. Cancer treatment and research. New York, USA: Springer, 2016. Vol. 167. 416p
15. Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment cell res.* 2005;18(3):150-9.
16. Wang JX, Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M. Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *J Cell Commun Signal.* 2016;10:190-6.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

17. Colombo S, Berlin I, Delmas V, Larue L. Classical and nonclassical melanocytes in vertebrates. In: Borovansky J, Riley PA, editors. *Melanins and melanosomes: Biosynthesis, biogenesis, physiological and pathological functions*. New Jersey, USA: Wiley-VCH, 2011. 1 ed. 429 p.
18. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Development*, 2015;142:620-32.
19. Virchow RLK. *Cellular pathology*, 1859 special ed., 204–207. London, UK: John Churchill, 1978.
20. Bonaventure J, Domingues MJ, Larue L. Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013;26(3):316-23.
21. Pandya P, Orgaz JL, Sanz-Moreno V. Modes of invasion during tumour dissemination. *Mol Oncol*. 2017;11(1):5-27.
22. Lin CM, Lin YL, Ho SY, Chen PR, Tsai YH, Chung CH, Hwang CH, Tsai NM, Tzou SC, Ke CY, Chang J, Chan YL, Wang YS, Chi KH, Liao KW. The inhibitory effect of 7, 7"-dimethoxyagastisflavone on the metastasis of melanoma cells via the suppression of F-action polymerization. *Oncotarget*, 2016. [epub ahead of print]
23. Wilson MA, Schuchter LM. Chemotherapy for melanoma. In: Kaufman HL, Mehnert JM (editors). *Melanoma. Cancer treatment and research*. New York: Springer, 2016. Vol. 167. 416p
24. Eggermont AMM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer*. 2004;40:1825-36.
25. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2135-47.
26. Lin J, Goto Y, Murata H, Sakaizawa K, Uchiyama A, Saida T, Takata M. Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutante alleles during progression. *Br J Cancer*. 2011;104(3):464-8.
27. Sensi M, Nicolini G, Petti C, Bersani I, Lozupone F, Molla A, Vegetti C, Nonaka C, Mortarini R, Parmiani G, Fais S, Anichini A. Mutually exclusive NRAS^{Q61R} and BRAF^{V600E} mutations at the single-cell level in the same human melanoma. *Oncogene*, 2006;25:3357-64.
28. Berger MF, Garraway LA. Applications of genomics in melanoma oncogene discovery. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009;23(3):397-414.
29. Wong DJ, Ribas A. Targeted therapy for melanoma. In: Kaufman HL, Mehnert JM (editors). *Melanoma. Cancer treatment and research*. New York: Springer, 2016. Vol. 167. 416p
30. Wilmott JS, Tembe V, Howle JR, Sharma R, Thomson JF, Rzos H, Lo RS, Kefford RF, Scolyer RA, Long GV. Intratumoral molecular heterogeneity in a BRAF-mutant, BRAF inhibitor-resistant melanoma: a case illustrating the challenges for personalized medicine. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(12):2704-8.
31. Davey RJ, Van Der Westhuizen A, Bowden NA. Metastatic melanoma treatment: combining old and new therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;98:242-53.
32. Ribas A, Hodi FS, Callahan M, Konto C, Wolchok J. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Eng J Med*. 2013;368(14):1365-6.
33. Gerhardsson L. Chapter 54 – Tellurium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M. *Handbook on the toxicology of metals*. 4th ed. 2015. Vol. 2, p. 1217-28.

34. Mussa Farkhani S, Valizadeh A. Review: three synthesis methods of CdX (X = Se, S or Te) quantum dots. *IET Nanobiotechnol.* 2014;8(2):59-76.
35. Deng Z, Zhang Y, Yue J, Tang F, Wei Q. Green and orange CdTe quantum dots as effective pH-sensitive fluorescent probes for dual simultaneous and independent detection of viruses. *J Phys Chem B.* 2007;111:12024-31.
36. Davis CD, Tsuji PA, Milner JA. Selenoproteins and cancer prevention. *Annu Ver Nutr.* 2012;32:73-95.
37. Moroder L. Isosteric replacement of sulfur with other chalcogens in peptides and proteins. *J Peptide Sci.* 2005;11:187-214.
38. Irons R, Carlson BA, Hatfield DL, Davis CD. Both selenoproteins and low molecular weight selenocompounds reduce colon cancer risk in mice with genetically impaired selenoprotein expression. *J Nutr.* 2006;136(5):1311-7.
39. Cunha RL, Gouvea IE, Juliano L. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. *An Acad Bras Cienc.* 2009;81(3):393-407.
40. Mahto SK, Vinod TP, Kim J, Rhee SW. Cytotoxic potentials of tellurium nanowires in BALB/3T3 fibroblast cells. *Bull Korean Chem Soc.* 2011;32(9):3405-10.
41. Forootanfar H, Amirpour-Rostami S, Jafari M, Forootanfar A, Yousefizadeh Z, Shakibaie M. Microbial-assisted synthesis and evaluation the cytotoxic effect of tellurium nanorods. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;49:183-9.
42. Huang W, Wu H, Li X, Chen T. Facile one-pot synthesis of tellurium nanorods as antioxidante and anticancer agents. *Chem Asian J.* 2016;11(16):2301-11.
43. Ba LA, Döring M, Jamier V, Jacob C. Tellurium: an element with great biological potency and potential. *Org Biomol Chem.* 2010;8(19):4203-16.
44. Kalechman Y, Albeck M, Oron M, Sobelman D, Gurwith M, Seghal SN, Sredni B. Radioprotective effects of the immunomodulator AS101. *J Immunol.* 1990;145(5):1512-7.
45. Kalechman Y, Albeck M, Oron M, Sobelman D, Gurwith M, Horwith G, Kirsch T, Maida B, Seghal SN, Sredni B. Protective and restorative role of AS101 in combination with chemotherapy. *Cancer Res.* 1991;51(5):1499-503.
46. Sredni B, Albeck M, Kazimirsky G, Shalit F. The immunomodulator AS101 administered orally as a chemoprotective and radioprotective agent. *Int J Immunopharmacol.* 1992;14(4):613-9.
47. Sredni B, Albeck M, Tichler T, Shani A, Shapira J, Bruderman I, Catane R, Kaufman B, Kalechman Y. Bone marrow-sparing and prevention of alopecia by AS101 in non-small-cell lung cancer patients treated with carboplatin and etoposide. *J Clin Oncol.* 1995;13(9):2342-53.
48. Rosenblatt-Bin H, Kalechman Y, Vonsover A, Xu RH, Da JP, Shalit F, Huberman M, Klein A, Strassmann G, Albeck M, Sredni B. The immunomodulator AS101 restores T(H1) type of response suppressed by *Babesia rodhaini* in BALB/c mice. *Cell Immunol.* 1998;184(1):12-25.
49. Kalechman Y, Gafter U, Da JP, Albeck M, Alarcon-Segovia D, Sredni B. Delay in the onset of systemic lúpus erythematosus following treatment with the immunomodulator AS101: association with IL-10 inhibition and increase in TNF-alpha levels. *J Immunol.* 1997;159(6):2658-67.

50. Kalechman Y, Gafter U, Gal R, Rushkin G, Yan D, Albeck M, Sredni B. Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *J Immunol.* 2002;169:384-92.
51. Sredni B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Semin Cancer Biol.* 2012;22(1):60-9.
52. Pessoa-Pureur R, Heimfarth L, Rocha JB. Signaling mechanisms and disrupted cytoskeleton in the diphenyl ditelluride neurotoxicity. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:1-21.
53. Roy S, Hardej D. Tellurium tetrachloride and diphenyl ditelluride cause cytotoxicity in rat hippocampal astrocytes. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(10):2564-74.
54. Vij P, Hardej D. Evaluation of tellurium toxicity in transformed and non-transformed human colon cells. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012;34(3):768-82.
55. Cunha RL, Urano ME, Chagas JR, Almeida PC, Bincoletto C, Tersariol IL, Comasseto JV. Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium(IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15(3):755-60.
56. Fry FH, Jacob C. Sensor/effector drug design with potential relevance to cancer. *Curr Pharm Des.* 2006;12(34):4479-99.
57. Piovan L, Alves MF, Juliano L, Brömme D, Cunha RL, Andrade LH. Structure-activity relationships of hypervalent organochalcogenanes as inhibitors of cysteine cathepsins V and S. *Bioorg Med Chem.* 2011;19(6):2009-14.
58. Brohem CA, Massaro RR, Tiago M, Marinho CE, Jasiulionis MG, de Almeida RL, Rivelli DP, Albuquerque RC, de Oliveira TF, de Melo Loureiro AP, Okada S, Soengas MS, de Moraes Barros SB, Maria-Engler SS. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. *Pigmen Cell Melanoma Res.* 2012;25(3):354-69.
59. Rangel M, Malpezzi EL, Susini SM, de Freitas JC. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon.* 1997;35(2):305-9.
60. Leatherbarrow RJ. *GraFit. Versão 5.0.12.* Horley, UK. Erithacus Software Ltd.; 2001.
61. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-5.
62. *GraphPad Prism. Versão 5.00.* San Diego, California, USA. Graphpad Software, Inc.; 2007.
63. Dolfini E, Bianchi E, Ubezio P, Volontè M, Fuhrman Conti AM. Genotoxic damage induced by doxorubicin in two human melanoma cell lines. *Cytotechnology.* 1987;1(1):95-7.
64. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E, HUMANMICRONUCLEUS project. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the human cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 2003;534(1-2):65-75.
65. Du P, Saidu NE, Intemann J, Jacob C, Montenarh M. A new tellurium-containing amphiphilic molecule induces apoptosis in HCT116 colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(6):1808-16.
66. Manzano JL, Layos L, Bugés C, de Los Llanos Gil M, Vila L, Martínez-Balibrea E, Martínez-Cardús A. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med.* 2016;4(12):237.

67. Duan L, Mukherjee EM, Narayan D. Tailoring the treatment of melanoma: implications for personalized medicine. *Yale J Biol Med.* 2015;88(4):389-95.
68. Poh S, Png E, Tong L. Quantitative image analysis of cellular morphology using Amnis® ImageStreamX Mark II imaging flow cytometer: a comparison against conventional methods. *Single Cell Biol.* 2015;S1:001.
69. Dent BM, Ogle LF, O'Donnell RL, Hayes N, Malik U, Curtin NJ, Boddy AV, Plummer ER, Edmondson RJ, Reeves HL, May FE, Jamieson D. High-resolution imaging for the detection and characterization of circulating tumour cells from patients with oesophageal, hepatocellular, thyroid and ovarian cancers. *Int J Cancer.* 2016;138(1):206-16.
70. Stark GR, Taylor WR. Analyzing the G2/M checkpoint. In: Schöntal AH, editor. *Methods in molecular biology: Checkpoint controls and cancer: Volume 1: reviews and model systems.* Totowa, USA: Humana Press Inc. 2004. vol. 280. 318 p..
71. Hayun M, Naor Y, Weil M, Albeck M, Peled A, Don J, Haran-Ghera N, Sredni B. The immunomodulator AS101 induces growth arrest and apoptosis in multiple myeloma: association with the Akt/survivin pathway. *Biochem Pharmacol.* 2006;72(11):1423-31.
72. Naor Y, Hayun M, Sredni B, Don J. Multiple signal transduction pathways are involved in G2/M growth arrest and apoptosis induced by the immunomodulator AS101 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2013;54(1):160-6.
73. Shaaban S, Sasse F, Burkholz T, Jacob C. Sulfur, selenium and tellurium pseudopeptides: synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem.* 2014;22(14):3610-19.
74. Mochizuki M, Kwon YW, Yodoi J, Masutani H. Thioredoxin regulates cell cycle via the ERK1/2-cyclin D1 pathway. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(12):2957-71.
75. McNaughton M, Engman L, Birmingham A, Powis G, Cotgreave IA. Cyclodextrin-derived diorganyl tellurides as glutathione peroxidase mimics and inhibitors of thioredoxin reductase and cancer cell growth. *J Med Chem.* 2004;47:233-9.
76. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
77. Abondanza TS, Oliveira CR, Barbosa CM, Pereira FE, Cunha RL, Caires AC, Comassetto JV, Queiroz ML, Valadares MC, Bincoletto C. Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium(IV) compound RT-04. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(7):2540-5.
78. Beauvais F, Michel L, Dubertret L. Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis. Role of K⁺ channels. *J Leukoc Biol.* 1995;57(6):851-5.
79. Liu J, Wang Z. Increased oxidative stress as a selective anticancer therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:1-12.
80. Jamier V, Ba LA, Jacob C. Selenium- and tellurium-containing multifunctional redox agents as biochemical redox modulators with selective cytotoxicity. *Chemistry.* 2010;16(36):10920-8.
81. Schmitt MW, Loeb LA, Salk JJ. The influence of subclonal resistance mutations on targeted cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(6):335-47.
82. Giles GI, Tasker KM, Johnson RJ, Jacob C, Peers C, Green KN. Electrochemistry of chalcogen compounds: prediction of antioxidant activity. *Chem Commun (Camb).* 2001;23:2490-1.

83. Sailer BL, Liles N, Dickerson S, Sumners S, Chasteen TG. Organotellurium compound toxicity in a promyelocytic cell line compared to non-tellurium-containing organic analog. *Toxicol In Vitro*. 2004;18(4):475-82.
84. Barnes D, Sato G. Growth of a human mammary tumour cell line in a serum-free medium. *Nature*, 1979;281:388-9.
85. Tveit KM, Fodstad Ø, Johannessen JV, Olsnes S. A human melanoma cell line established from xenograft in athymic mice. *Br J Cancer*. 1980;41:724-33.
86. Fenech M. A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis*, 2000;15(4):329-36.
87. Sredni B, Shani A, Catane R, Kaufman B, Strassmann G, Albeck M, Kalechman Y. Predominance of TH1 response in tumor-bearing mice and cancer patients treated with AS101. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(18):1276-84.
88. Silberman A, Albeck M, Sredni B, Albeck A. Ligand-substitution reactions of the tellurium compound AS-101 in physiological aqueous and alcoholic solutions. *Inorg Chem*. 2016;17(10):10847-50.
89. Princival CR, Archilha MVL, dos Santos AA, Rodrigues-Oliveira AF, Cunha RLOR, Comasseto JV. A stability study of hypervalent tellurium compounds in aqueous solutions. *Inorg Chem*. 2017 [Artigo submetido para publicação].
90. Silva MS, Andrade LH. ⁷⁷Se and ¹²⁵Te NMR spectroscopy on a selectivity study of organochalcogenanes with L-amino acids. *Org Biomol Chem*. 2015;13(21):5924-9.
91. Nguyen LA, He H, Pham-Huy C. Chiral drugs: an overview. *Int J Biomed Sci*. 2006;2(2):85-100.
92. Chhabra N, Aseri ML, Padmanabhan D. A review of drug isomerism and its significance. *Int J Appl Basic Med Res*. 2013;3(1):16-8.
93. Kim JH, Scialli AR. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicol Sci*. 2011;122(1):1-6.
94. Agranat I, Caner H, Caldwell J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(10):753-68.
95. Mecklenburg S, Shaaban S, Ba LA, Burkholz T, Schneider T, Diesel B, Kiemer AK, Röseler A, Becker K, Reichrath J, Stark A, Tilgen W, Abbas M, Wessjohann LA, Sasse F, Jacob C. Exploring synthetic avenues for the effective synthesis of selenium- and tellurium-containing multifunctional redox agents. *Org Biomol Chem*. 2009;7(22):4753-62.
96. Giles NM, Gutowski NJ, Giles GI, Jacob C. Redox catalysis as sensitizers towards oxidative stress. *FEBS Lett*. 2003;535(1-3):179-82.

ANEXOS

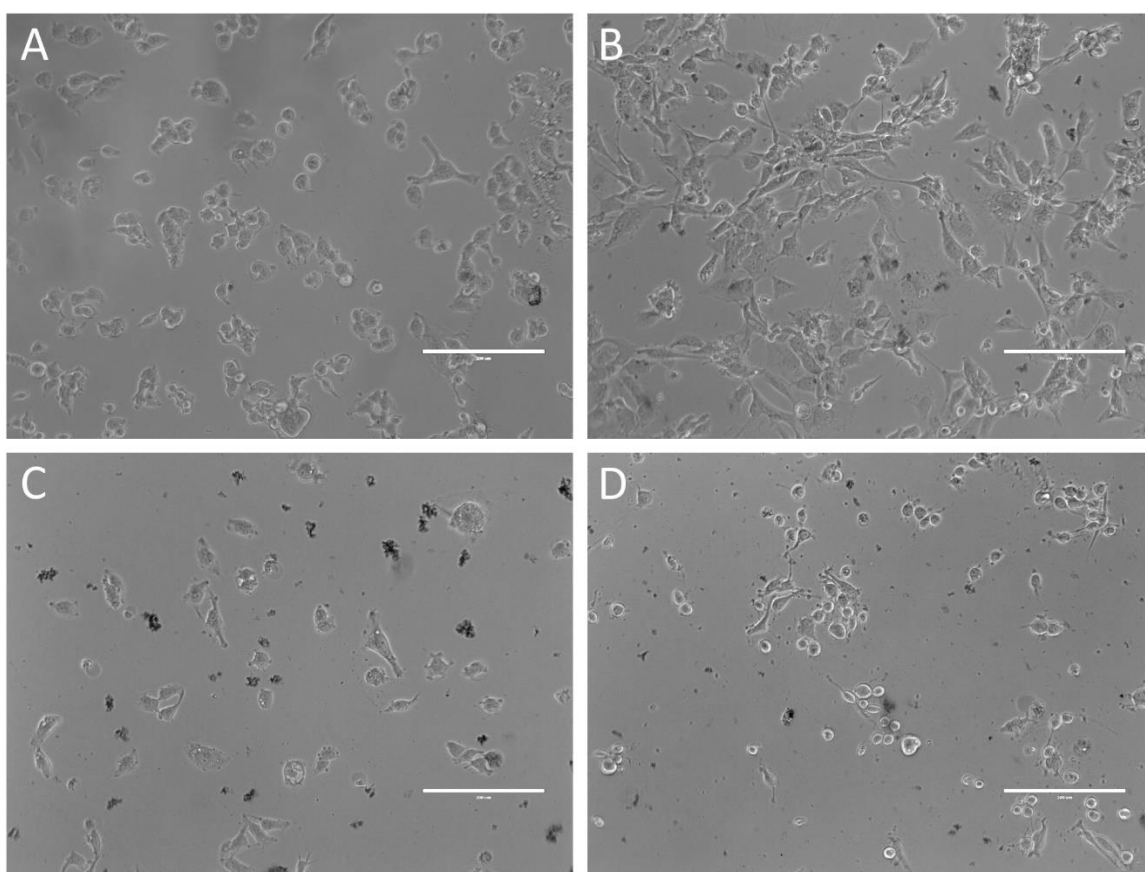


Figura A1 – Fotomicrografia de células tratadas com diferentes compostos. A: SK-Mel-147 tratada com citocalasina B; B: SK-Mel-147 tratada com doxorubicina; C: SK-Mel-147 tratada com a combinação citocalasina-B + doxorubicina; D: HT-144 tratada com citocalasina-B + doxorubicina