JENNIFER ELIANA MONTOYA NEYRA

**Modulação dos efeitos citotóxicos do vemurafenibe
pela cloroquina em células de melanoma maligno
G-361: papel da dermucidina**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

JENNIFER ELIANA MONTOYA NEYRA

**Modulação dos efeitos citotóxicos do vemurafenibe
pela cloroquina em células de melanoma maligno
G-361: papel da dermucidina**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Ernesto
Belizário

Versão corrigida. A versão original
eletrônica, encontra-se disponível
tanto na Biblioteca do ICB quanto na
Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

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)

Montoya Neyra, Jennifer Eliana

Modulação dos efeitos citotóxicos do vemurafenibe
pela cloroquina em células de melanoma maligno G-
361: papel da dermicitina / Jennifer Eliana Montoya
Neyra; orientador José Ernesto Belizário. -- São
Paulo, 2017.

90 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Melanoma. 2. BRAF. 3. vemurafenibe. 4.
cloroquina. 5. autofagia. I. Belizário, José
Ernesto, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Jennifer Eliana Montoya Neyra

Título da Dissertação/Tese: Modulação dos efeitos citotóxicos do vemurafenibe pela cloroquina em células de melanoma maligno G-361: papel da dermicidina

Orientador: Prof. Dr. José Ernesto Belizário

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o (a) candidato (a): () **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

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
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "*Papel da dermicidina no mecanismo de resistência da atividade citotóxica do inibidor de BRAF mutado ZELBORAF/VE-MURAFENIBE em células de melanoma maligno humano*", registrada sob nº 025, nas fls. 29, do livro 03, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 25 de maio de 2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da **Lei Federal nº 11.794**, o Dr. (Dra.) José Ernesto Belizário (Investigador Principal) e os membros da equipe Jennifer Eliana Montoya Neyra. Esta licença de uso de animais expira em 25 / 05 / 2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP **até o último dia de validade da atual proposta**. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "*Role of dermicidin in the mechanism of resistance to the cytotoxic activity of Zelboraf/Vemurafenib - inhibitor of mutated BRAF - in human malignant melanoma cells*", registered as Number 025, in pages 29 of book 03, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 05/25/2015.

Under this license, José Ernesto Belizário (Principal Investigator) and team members Jennifer Eliana Montoya Neyra are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the **Brazilian Federal Law nº 11.794**.

This license expires in 05 / 25 / 2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 25 de maio de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. Ana Paula Lepique
Secretária- CEUA - ICB/USP

A meus pais, Eliana e Edgar, a minhas irmãs, Angie
e Joana por todo seu amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado durante estes anos de estudo.

A Deus.

Ao Prof. Belizário, pela a orientação nesses anos, pela paciência, pela confiança e por todo o apoio na realização deste projeto.

A professora Dra. Gláucia Machado-Santelli e o pessoal do seu laboratório, pelo seu apoio e amizade, especialmente a Analí pela sua boa disposição, ajuda, paciência e amizade.

A meus amigos e colegas do laboratório, Arthur, Izabela, Beatriz, Samara e Dayble pela sua amizade e apoio científico.

A meus amigos peruanos em SP, Katherine, Richard, Éricka, Armando, Cesti, Erick, Juan Carlos, Ivan, e muito especialmente a Salvador pelo incentivo e sempre compartilhar comigo os momentos mais importantes na minha vida.

A minha família, pelo seu apoio incondicional, pelos bons desejos, beijos, abraços e carinhos fornecidos, que a pesar dos milhes de quilômetros que nos separam sempre chegaram cálidos ao abrigo do meu coração.

RESUMO

NEYRA JEM. **Modulação dos efeitos citotóxicos do vemurafenibe pela cloroquina em células de melanoma maligno G-361: papel da dermicidina.** 2017. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Neste estudo foram avaliados os efeitos farmacológicos do vemurafenibe, um inibidor da proteína serina/treonina BRAF com mutação no aminoácido V600E, e da cloroquina, um inibidor de autofagia na viabilidade celular e crescimento tumoral de melanomas. Nos ensaios in vitro e in vivo foram utilizadas as sublinhagens derivadas das células de melanoma humano G-361, a primeira denominada de G-361-pLKO, que expressa o gene da proteína DCD, e a segunda, denominada G-361-IBC I, que expressa shRNA que atua como RNA de interferência inibindo a síntese da proteína DCD. Os estudos in vitro mostraram que as células de melanoma G-361 são sensíveis vemurafenibe indicando a presença da proteína BRAF^{V600E} mutante. A associação de vemurafenibe (2 μ M) e cloroquina (100 μ M) promoveu um aumento significativo das taxas de apoptose, enquanto diminui as taxas de células senescentes que expressam a enzima β -galactosidase. Vemurafenibe na dose 50 mg/kg administrado durante 21 dias inibiu o crescimento de tumores de células de melanoma G-361 em camundongos imunodeficientes dependente da expressão da dermicidina. Cloroquina administrada na dose 30 mg/kg em combinação com vemurafenibe (50 mg/kg), a cada 24 horas, acelerou, enquanto administrada a cada 72 horas, reduziu o crescimento de células de melanoma G-361 nos camundongos imunodeficientes. Todos os animais experimentaram perda significativa da massa tumoral e do peso corpóreo ao longo do tratamento com vemurafenibe. Os tumores derivados das sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC I apresentaram padrões morfológicos e celulares alterados e padrões histológicos e nucleares atípicos como também vasos sanguíneos malformados. As massas tumorais apresentaram regiões de necrose tumoral e vasos sanguíneos de tamanhos reduzidos. Não se detectou a expressão dos biomarcadores de diferenciação melanocítica S100, HMB-45, Mela-A ou citoqueratinas. Em resumo este trabalho confirma o potencial e eficácia do vemurafenibe como inibidor da proteína BRAF^{V600E} mutante e sugere que a cloroquina pode ser um potencial adjuvante no tratamento de pacientes com melanomas. Além disso, esta pesquisa confirma o papel da dermicidina como um oncogene e fator de crescimento de células de melanomas malignos.

Palavras-chave: Melanoma, BRAF, vemurafenibe, cloroquina, autofagia, senescência.

ABSTRACT

NEYRA JEM. **Modulation of cytotoxic effects of vemurafenib by chloroquine in malignant melanoma cells G-361: role of dermcidin.**

[Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017.

In this study we evaluated the pharmacological effects of vemurafenib, an inhibitor of serine/threonine kinase BRAF with amino acid V600E mutation, and chloroquine, an autophagy inhibitor in cell viability and tumor growth of melanomas. In *in vitro* and *in vivo* assays we used two derivatives of the human melanoma cell line G-361, one identified as G-361-pLKO, which expresses the DCD protein gene, and the other identified as G-361-IBC I which expresses shRNA that acts as RNA interference and inhibits DCD protein synthesis constitutively. *In vitro* studies have shown that G-361 melanoma cells are susceptible to vemurafenib at doses from 1-2 μM confirming that it expresses the oncogenic mutant form of the BRAF^{V600E} protein. The combination of vemurafenib and chloroquine promoted a significant increase in apoptosis rates, while decreasing the rates of senescent cells expressing the β -galactosidase enzyme. Administration of vemurafenib at doses 50 mg/kg for 21 days inhibited the growth of G-361 melanoma cell tumors in immunodeficient mice dependent of dermcidin expression. Chloroquine at dose 30 mg/kg, in combination with vemurafenib, at dose 50 mg/kg for 21 days, accelerated, when giving at 24 hour interval, and reduced, when giving at 72 hours interval, the growth of G-361 melanoma cells in immunodeficient mice. All animals experienced significant loss of tumor masses and body weight throughout the treatment with vemurafenib at dose 50 mg/kg for 21 days. Tumor tissues derived from animal bearing G-361-pLKO and G-361-IBC I cell lines showed atypical cell morphology and nuclear histological patterns and malformed blood vessels. Tumor masses showed large regions of tumor necrosis and blood vessels of reduced size. Expression of melanocytic differentiation biomarkers S100, HMB-45, Melan-A or pancytokeratins was not detected in tumor tissue slides. In summary, this work confirms the potential and efficacy of vemurafenib as inhibitor of mutant BRAF^{V600E}, and suggests that chloroquine can be a potential adjuvant to treat melanoma patients. In addition, this research confirms the role of dermcidin as an oncogene and growth factor for malignant melanoma cells.

Keyword: Melanoma, BRAF, dermcidin, vemurafenib, chloroquine, apoptosis, autophagy, senescence

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Câncer	12
1.2	Melanoma	21
1.3	Características imuno-histopatológicas dos melanomas	25
1.4	Dermicidina	26
1.5	Farmacoterapia do melanoma	31
1.6	Vemurafenibe	33
1.7	Resistência ao tratamento inibitório de BRAF	34
1.8	Caquexia no câncer	36
1.9	Autofagia no câncer	37
1.10	Cloroquina	38
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivo geral	40
2.2	Objetivos específicos	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Ensaio da atividade citotóxica do vemurafenibe e cloroquina <i>in vitro</i>	41
3.1.1	Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT	41
3.1.2	Deteção de núcleos apoptóticos por fluorescência com coloração DAPI	42
3.1.3	Ensaio de atividade da β -Galactosidase de células senescentes	42
3.2	Ensaio da atividade antitumoral da vemurafenibe e cloroquina <i>in vivo</i>	43
3.2.1	Monitoramento de variação de peso corporal	47
3.2.2	Monitoramento do crescimento tumoral	47
3.2.3	Coleta de amostras biológicas	48
3.3	Análises histopatológicas	49
3.3.1	Inclusão em parafina	49
3.3.2	Coloração Hematoxilina & Eosina	49
3.4	Análise imuno-histoquímica	50
3.5	Análise microscópica	52

3.6	Análises Estatísticas.....	52
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Atividade citotóxica da vemurafenibe e cloroquina <i>in vitro</i>.....	53
4.1.1	<i>Ensaio de MTT.....</i>	53
4.1.2	<i>Ensaio de núcleos apoptóticos por coloração com DAPI.....</i>	56
4.1.3	<i>A atividade da β-Galactosidase associada a senescência celular.....</i>	58
4.2	Atividade antitumoral da vemurafenibe e cloroquina <i>in vivo</i>.....	60
4.2.1	<i>Grupo Experimental 1.....</i>	60
4.2.2	<i>Grupo Experimental 2.....</i>	62
4.2.3	<i>Grupo Experimental 3.....</i>	63
4.2.4	<i>Monitoramento de variação de peso corporal.....</i>	65
4.2.5	<i>Monitoramento da variação do crescimento tumoral.....</i>	65
4.2.6	<i>Análise dos efeitos farmacológicos da vemurafenibe sobre órgãos e células dos sistemas imunológico e hematológico.....</i>	66
4.3	Achados histopatológicos dos tumores de células de melanoma G-361.....	71
4.4	Análises imuno-histoquímicas.....	73
5	DISCUSSÃO.....	75
6	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

A palavra “câncer” tem sua primeira descrição na história da humanidade em 3000 a.C. no Egito em um papiro médico que relata a cirurgia de um trauma causado por tumores e úlceras de mama. Em seguida, Hipócrates (460-370 a.C.), conhecido como “Pai da Medicina” utilizou as expressões *karkinos*, *carcinos* e *carcinoma* para descrever os tumores (do latim *tumor*, inchaço). A expressão “*karkínos*” de procedência grega refere-se ao caranguejo, o crustáceo que identifica a doença. As projeções que circundam os vasos que alimentam os tumores e que se espalham, adquirem a aparência semelhante aos das patas deste crustáceo. A partir dos relatos do físico romano Galeno (130-200 d.C.), o termo latino *cancru*, que significa câncer, passou a ser adotado para identificar as neoplasias (crescimento anormal) ou tumores (American Cancer Society, 2015).

Em meados do século XX, a partir da descoberta de Watson e Crick sobre a estrutura do DNA, que os demais cientistas conheceram a natureza e complexidade química e biológica do material genético necessárias para continuar com a investigação da etiologia e desenvolvimento do câncer. O DNA é compreendido como o código genético o qual dirige o funcionamento celular e a origem do câncer quando o código é danificado na forma de mutações pontuais, translocação, amplificação, deleção, ou ganho do material genético. O dano ao DNA pode ser provocado por agentes externos como compostos químicos, radiação e vírus, ou resultado da ação de agentes internos produzidos nas próprias células e que determinam na ativação de oncogenes, alteração de genes supressores de tumores, alteração de genes de reparo do DNA, que, finalmente levam ao desenvolvimento do crescimento desordenado e imortalidade que caracterizam as células cancerosas (Hanahan, Weinberg, 2011; Weinberg, 2016).

Em geral, se sabe que os tecidos são formados por células e os produtos delas, e que estas surgem mediante a divisão celular de uma célula preexistente, assim, um organismo complexo é formado a partir de uma única célula por intermédio dos ciclos celulares repetitivos, crescimento e

diferenciação celular. Por conseguinte, se observou que as massas tumorais derivam inicialmente de células normais de tecidos normais e que formam um primeiro tumor chamado de tumor primário, que no decorrer da doença, nas etapas finais, pode apresentar atividade metastática. Esta é definida como capacidade celular de se movimentar e invadir outros tecidos, próximos ou distantes, espalhando-se pelo corpo do indivíduo, formando novas massas tumorais em locais distantes ao ponto de sua origem. Em consequência, mediante análise histopatológica, todo câncer pode ser rastreado de volta para o tecido inicial de onde se originou o tumor primário, permitindo assim a classificação e diferenciação de mais de 100 diversos tipos de cânceres (INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA), 2016; Weinberg, 2016).

Os estudos histológicos mostraram que os tumores de maior relevância são os derivados células epiteliais, pois originam os carcinomas, que são responsáveis pelo maior número de óbitos entre as populações (80% no ocidente). Estes carcinomas se originam a partir das células de camadas epiteliais do trato gastrointestinal, glândula mamária, pâncreas, pulmão, fígado, vesícula biliar, bexiga, pele e ovários. Por outro lado, o tecido epitelial que forma o revestimento de ductos e cavidades internas dá origem aos adenocarcinomas, no caso de órgãos como os pulmões, útero e cérvix podem coexistir junto com células tumorais de carcinoma. Os demais tumores malignos, não epiteliais, são formados principalmente por dois grandes grupos, sendo o maior deles denominado de sarcoma, o qual é constituído de células que derivam do tecido conjuntivo, fibroblastos, adipócitos, osteoblastos e miócitos. O segundo maior grupo de tumores não epiteliais é desenvolvido a partir das células formadoras do sangue, incluindo o câncer das células do sistema imune chamado de leucemia e o hematológico conhecido por linfoma. O terceiro maior grupo de tumores não epiteliais é conhecido como tumores neuroectodermais e se originam das células do tecido nervoso central e periférico, o qual é constituído por gliomas, glioblastomas, neuroblastomas, schwannomas e meduloblastomas. Além desses quatro principais grupos de cânceres, existem alguns outros originados de células específicas, como o melanoma que é formado a partir dos melanócitos. Morfologicamente, os tumores podem ser constituídos por uma população de células homogêneas as quais são originadas a partir de uma única célula ancestral comum, que

compartilham os mesmos marcadores bioquímicos e funcionais dentro no microambiente tumoral, estas células formam uma população monoclonal. Também, os tumores podem ser policlonais, formados por subpopulações de células que apresentam heterogeneidade morfológica, genética e epigenética, envolvendo a presença de diferentes marcadores de membrana e uma cinética de proliferação celular e resposta à terapia farmacológica bem diversificada (Visvader, Lindeman, 2008).

Figura 1 – Células tumorais e os diferentes tipos celulares que participam do microambiente tumoral. Fonte: Adaptação de Hanahan, Weinberg, 2011.

O microambiente tumoral pode ser constituído por diferentes tipos de células, como segue: células cancerosas, células imunes e inflamatórias, fibroblastos, células endoteliais, pericitos e células-tronco cancerosas (*cancer stem cells* ou CSCs) (Figura 1). As CSCs têm a capacidade de se autorrenovar e gerar células pluripotentes mediante o processo de divisão assimétrica. Elas são responsáveis pelo crescimento e manutenção tumoral principalmente nas etapas mais avançadas da doença. Além disso, estas células vêm sendo identificadas como potenciais responsáveis pela resistência adquirida aos

agentes quimioterápicos durante o tratamento anticâncer (Visvader, Lindeman, 2008; Weinberg, 2016).

As células cancerosas apresentam certas características adquiridas no processo da tumorigênese, que incluem a sinalização sustentada para a proliferação, evasão dos sinais supressores do crescimento, resistência à morte celular, promoção da inflamação, capacidade replicativa ilimitada (imortalização), indução de angiogênese e a capacidade de invasão e de fazer metástase, instabilidade genômica e mutações, desregulação energética da célula, capacidade de escape da vigilância do sistema imune, são ilustradas na Figura 2 (Hanahan, Weinberg, 2011; Meyer et al., 2012; Lee et al., 2014).

Na sinalização sustentada para a proliferação estão envolvidos a desregulação dos sinais de crescimento, ciclo celular e metabolismo. Estes processos estão regulados positivamente pela ativação das vias de sinalização mediadas por receptores com domínios intracelulares de tirosina cinase ativados por fatores de crescimento ou mitógenos. Esta via é também alterada por mutações nas enzimas cinases conferindo-lhe independência dos fatores de crescimento e mitógenos, uma vez que estas mutações ativam constitutivamente estas enzimas cinases. Por exemplo, o produto de uma mutação na proteína cinase ativada por mitógeno (MAPKKK) denominada BRAF. A substituição do resíduo de valina por ácido aspártico na posição do aminoácido 600 ativa constitutivamente a via de sinalização RAS / RAF / MEK / ERK (Davies, Samuels, 2010). Mutações e consequentemente alteração nas sinalizações de retroalimentação negativa, por exemplo, no oncogene RAS, comprometem a atividade transitória da proteína RAS-GTPase, estimulando a proliferação celular das células. Outro mecanismo análogo é mediado por mutações na fosfatase denominada PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10), que provoca a perda da sua capacidade de hidrólise do produto da atividade da fosfoinositol-3-cinase (PI3K) e assim um aumento do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃), e incremento na proliferação celular tumoral (Hanahan, Weinberg, 2011; Lee et al., 2015).

Quanto à evasão dos sinais supressores do crescimento, a proteína retinoblastoma (RB) integra sinais externos que regulam o crescimento e divisão celular, e sua perda por deleção permite uma persistente proliferação celular. A proteína p53 é também um fator supressor de crescimento que

integra vários sinais intrínsecos provocados por estresse de retículo endoplasmático, níveis subótimos de glicose e oxigenação. A ativação da p53 interrompe a progressão do ciclo celular até que as atividades sejam normalizadas. Alternativamente, quando o dano celular ou genômico é irreparável, a p53 desencadeia a apoptose. Tanto a via da p53 como a via da RB são da maior importância para a supressão da proliferação celular e formação de tumores (Hanahan, Weinberg, 2011; Ebata et al., 2016).

Figura 2 – Características comuns adquiridas pelas células cancerosas durante o processo de tumorigênese. Fonte: Adaptação de Hanahan, Weinberg, 2011.

A resistência à morte celular programada por apoptose é outra capacidade adquirida pelas células cancerosas. A apoptose é mediada por mecanismos reguladores e efetores, através das vias extrínseca e intrínseca. Em ambos os casos ocorre a ativação das caspases reguladoras 8 e 9, respectivamente, que por sua vez ativam as caspases efetoras -3, -6 e -7 que

iniciam uma cascata de proteólise provocando finalmente a fragmentação e degradação da própria célula. Normalmente, os desencadeantes apoptóticos que fazem a ligação entre os reguladores e efetores encontram-se em contrabalanço, sendo os membros pró-apoptóticos (exemplos: Bax, Bak, Bok, Bid, Bad, Noxa, Puma, Hrk) e anti-apoptóticos (exemplos: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl2A1, Bcl-b) da família Bcl-2, responsáveis pela determinação da morte celular. Na diminuição da atividade anti-apoptótica, as proteínas Bax e Bak interagem e interrompem a integridade da membrana mitocondrial externa provocando a liberação de proteínas de sinalização pró-apoptóticas como o citocromo c. Este promove a ativação da caspase-9 e início da cascata proteolítica mediada pelas caspases executoras que produz várias alterações associadas ao processo apoptótico (Belizário et al., 2007). No câncer, a principal anormalidade na regulação apoptótica é produzida pela perda da funcionalidade do supressor tumoral p53, a qual atua como um sensor de indução de morte. A p53 promove o aumento das proteínas pró-apoptóticas PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) e Noxa, levando a morte de células tumorais (Elmore, 2007).

A necrose, é outro tipo de morte causada pelo desgaste energético durante ajustes do sistema homeostático de regulação metabólica. Em comparação com a apoptose, a célula necrótica incha até estourar vertendo o seu conteúdo no microambiente que a rodeia. As células em processo de necrose liberam sinais pró-inflamatórias promovendo febre e inflamação, como também alterações do microambiente circundante, estimulando logo as células vizinhas a produzir fatores de crescimento e quimiotáticos (Meng et al., 2016).

A célula cancerígena também apresenta a capacidade de replicação ilimitada ou imortalização (Hanahan, Weinberg, 2011; Wu et al., 2017). Em uma célula não tumoral, após alguns ciclos de divisão e crescimento ininterruptos, a célula atravessa certas barreiras de proliferação como a senescência, um estado de viabilidade não proliferativo e, finalmente, um estado conhecido como crise, no qual a célula finalmente se suicida. A telomerase (TR) é quase ausente nas células diferenciadas normais. Esta enzima DNA polimerase tem a capacidade de replicar os extremos do DNA para alongar os telômeros e aumentar os futuros ciclos de divisão. A TR normalmente se encontra ativa nos tecidos fetais, em células-tronco e células das linhagens germinais. Em células

cancerosas, a TR é altamente expressa para controlar a erosão dos telômeros e assim manter a proliferação celular, e finalmente a imortalização espontânea das células em transição (Hanahan, Weinberg; 2011; Wu et al., 2017).

Outra capacidade adquirida nas células cancerosas é a indução da angiogênese, mediante a qual elas obtêm nutrientes, oxigênio e liberam os produtos do catabolismo celular. Nos processos fisiológicos como na embriogênese, no ciclo reprodutivo feminino ou na recuperação de feridas, o processo de angiogênese é transitório. No câncer a angiogênese encontra-se constantemente ativa e contribui na tumorigênese e sustentação de novos tumores. A expressão dos fatores indutores da angiogênese como o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A), como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fatores inibidores como a tromboesponidina 1 (TSP-1), pode ser regulada por oncogenes e outros fatores. Por exemplo, a expressão de VEGF-A é regulada por sinalização oncogênica de RAS, RAF, MEK, PI3K, c-Myc, ou por estresse oxidativo produzido por hipóxia. A ativação crônica da angiogênese nos tecidos tumorais e descontrole da sinalização pró-apoptótica produzem novos vasos sanguíneos que crescem desorganizadamente, com amplas ramificações, fluxo sanguíneo irregular, extravasamento de fluídos, níveis anormais de células endoteliais com um perfil de proliferação e de apoptose alterados, além de microhemorragias (Rak et al., 2000; Freedman et al., 2011).

A malignidade do câncer ocorre principalmente pela sua capacidade invasiva e metastática (Hanahan, Weinberg, 2011). O processo de metástase requer alterações morfológicas profundas que depende de expressão de proteínas de adesão intercelulares como as integrinas e caderinas, matriz extracelular (ECM) e metaloproteinases. Um exemplo é a alteração na expressão da proteína E-caderina que regula as junções intercelulares e a interação de células epiteliais e fibroblastos do tecido normal. A E-caderina encontra-se pouco expressa ou inativada nos carcinomas de maior agressividade e grande motilidade e invasão (Hanahan, Weinberg, 2011).

Quanto à instabilidade genética no câncer, sabe-se que células normais apresentam uma baixa taxa de mutações espontâneas intrínsecas durante a geração de uma nova célula-filha. A mutação dos genes relacionados à tumorigênese pode ser causada por fatores intrínsecos e agentes mutagênicos

extrínsecos. Seus efeitos podem interferir com os componentes da regulação genômica na detecção de dano no DNA, ativação da maquinaria de reparação do DNA, reparo direto do DNA danificado, inativação de agentes mutagênicos antes de danificarem do material genético. Por exemplo, um caso de instabilidade genômica está associado ao encurtamento do telômero que pode atuar como supressor tumoral. O mecanismo envolve a ativação sustentada da via de sinalização de reparo de DNA promovido pelas enzimas cinases ATM e ATR que são induzidas por telômeros danificados (Maciejowski, Lange, 2017).

A proliferação sustentada das células cancerosas envolve também a capacidade de regular o metabolismo energético da célula com o propósito de impulsionar a sua divisão e crescimento (Kroemer, Pouyssegur, 2008). Em condições aeróbicas, a célula normal converte a glicose em piruvato no citosol mediante o processo de glicólise. Em seguida, o piruvato é convertido em dióxido de carbono por meio do ciclo de Krebs na mitocôndria, mas em condições de baixa concentração de oxigênio (hipóxia), o piruvato formado é reduzido a lactato para sua posterior secreção. Nas células cancerosas o consumo da glicose, ainda que abaixo dos valores normais de oxigênio, é convertido principalmente em lactato. Este metabolismo ineficiente de glicose gera duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) pela via anaeróbia, enquanto que 36 moléculas de ATP são geradas pelo ciclo de Krebs. O alto consumo de glicose pela célula cancerígena é influenciado pela hiperatividade de genes reguladores do metabolismo celular, como exemplo, RAS, PI3K, PIP3, c-Myc e dos fatores transportadores de glicose (GLUT1 e GLUT3). Por exemplo, níveis elevados do GLUT1 são comuns nos tumores sólidos e hematopoiéticos (Kroemer, Pouyssegur, 2008; Parmenter, 2014).

O sistema imune desempenha papel importante na resistência a tumorigênese e micrometástase (Chen, Mellman, 2017). O tecido tumoral suprime a resposta imune através de adoção de alterações na expressão de genes que permitem à célula tumoral escapar da detecção imunológica. Duas proteínas destacam na ativação da regulação negativa, o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4) e a proteína de morte programada 1 (PD-1) (Chen, Mellman, 2017). A CTLA-4 controla a ativação das células T por competição com o antígeno CD28 (*cluster of differentiation 28*) e CD86 (*cluster of differentiation 86*). Já a PD-1 é uma proteína de membrana que evita a

ativação de células T ao ligar-se ao ligante de proteínas de morte programada 1 (PDL-1) e PDL-2, reduzindo a imunidade e desta forma promovendo a resistência a morte celular por células T citotóxicas e natural killers (NKs) (Chen, Mellman, 2017).

Por último, o processo de metástase provoca que células tumorais sejam espalhadas pelo organismo formando tumores secundários, o qual envolve uma série de etapas dependentes das propriedades intrínsecas do tumor e a resposta própria do hospede (Talmadge, Filder, 2010). Segundo estabelecido na teoria da semente e solo, inicialmente, as células tumorais passam pela transição epitélio-mesênquima, e em seguida, ocorre a invasão local com a ajuda da degradação do estroma por enzimas metaloproteinases (Talmadge, Filder, 2010). O desprendimento e embolização das células tumorais na circulação local vascular e linfática, e posteriormente, a retenção destas formações tumorais nos capilares, extravasação e proliferação celular no parênquima do órgão de destino. A vascularização e resistência à resposta imune do hospede pode reiniciar o processo de metástase a partir de uma metástase preexistente (Talmadge, Filder, 2010).

Hoje sabemos que as células tumorais entram em estados de dormência ou senescência, e assim o aparecimento de metástases pode ocorrer muitos anos depois da erradicação do tumor primário. A senescência celular é uma forma especial de bloqueio no ciclo celular que serve para prevenir tumores (He, Sharpless, 2017). Células senescentes exibem um aumento da atividade da enzima beta-galactosidase lisossomal. Elas também passam a secretar grandes quantidades das citocinas IL-1 α e - β e IL-6, e quimiocinas IL-8 e CXCL1 via ativação da via NF- κ B. Por outro lado, existe uma forte associação da senescência (envelhecimento) de células com encurtamento dos telômeros, a ativação do promotor dos genes p16/INK4a e ARF, p38 MAPK, p53 e RB que são genes de grande significância na indução de tumores (He, Sharpless, 2017).

1.2 Melanoma

O melanoma é um câncer que tem origem na epiderme e mucosas a partir dos melanócitos (Figura 3). Os nevos melanocíticos da pele são agregados que podem adquirir características displásicas (morfologia anormal).

Os nevos têm uma alta probabilidade para gerarem melanomas e metástases para tecidos próximos e a outras partes do corpo (Hawryluk, Tsao, 2015).

Figura 3 – Estruturas e tipos celulares encontrados na epiderme da pele humana em corte histológico corado com hematoxilina e eosina.

Os melanomas são tumores com grande heterogeneidade genotípica e fenotípica. O microambiente tumoral no melanoma é formado por subpopulações de células iniciadoras que apresentam a capacidade de renovação e pluripotência celular similar a de células-tronco cancerosas (CSCs). Segundo dados coletados da análise de amostras de pacientes, os padrões de expressão de CSCs não obedecem a uma diferenciação organizada ou uma estrutura hierárquica. Pelo contrário, a geração de CSCs obedece ao modelo estocástico ou espontâneo, onde a seleção e expansão das subpopulações são influenciadas por certos fatores como a hipóxia, fator de crescimento e citocinas presentes no microambiente tumoral (Quintana et al., 2010). Em consequência, biomarcadores específicos são usados no

reconhecimento das CSCs presentes no microambiente tumoral. As subpopulações podem ser identificadas por marcação do antígeno CD20 (*cluster of differentiation* 20), o qual está relacionado com o desenvolvimento da agressividade tumoral; por marcação do antígeno CD133 (*cluster of differentiation* 133); por reconhecimento da glicoproteína ABCB5 (ATP-binding cassette sub-family B member 5), relacionada a evasão da imunidade antitumoral, resistência a quimioterapia e angiogênese. As subpopulações também são identificadas pela marcação do antígeno CD271 (*cluster of differentiation* 271), envolvido no prognóstico de tumores com alto potencial metastático; pela presença da enzima histona desmetilase JARID1B, relacionada a inibição da respiração mitocondrial; e pela marcação da enzima aldeído desidrogenase 1 (ALDH1), a qual está envolvida na resistência ao tratamento quimioterápico (Maurer et al., 2012; Lee et al., 2014; Shannan et al., 2016).

O melanoma cutâneo originado na pele é influenciado por certos fatores de risco como ter a pele clara e de fácil bronzeado. Também, a exposição à luz solar por longos períodos da vida, ou pela exposição a fatores de risco ambientais como a radiação. E ainda, os antecedentes familiares de melanoma, ou também se o indivíduo tem um sistema imune debilitado, ou ainda se padece de Parkinson, ou se for portador de certos oncogenes associados aos tumores de pele (Lu et al., 2016; Shannan et al., 2016). Este tipo de câncer apresenta um alto número de mutações implicadas na regulação de diferentes vias de sinalização envolvidas no controle do crescimento e migração celular (Figura 4). A principal via que se encontra alterada é a via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK), a qual se encontra ativada constitutivamente. A ligação de um mitógeno com seu receptor de tipo de tirosina cinase, receptores acoplados a proteína G desencadeia fosforilações consecutivas na cascata de enzimas cinases RAS / RAF / MEK / ERK (Figura 5).

Figura 4 – Resumo das principais alterações genéticas identificadas em tumores derivados de pacientes com diagnóstico de melanoma maligno. Fonte: Adaptado de Shannan et al., 2016.

No melanoma ocorre a ativação sustentada desta via levando a proliferação contínua das células. Isto se dá devido a uma mutação no código genético do oncogene homólogo b1 do sarcoma viral murino V-RAF (BRAF). A substituição do aminoácido valina (V600) por ácido aspártico (V600E) é a mutação que tem maior frequência, aproximadamente 50% entre os casos de melanoma. Outra mutação comum ocorre no oncogene homólogo de neuroblastomas viral V-RAS (NRAS) que está presente em 20-25% de melanomas, e que também participa da via de sinalização RAS / RAF / MEK / ERK sempre ativa (Wagle et al., 2011; Wilson et al., 2012; Abel et al., 2013; Lu et al., 2016; Shannan et al., 2016).

Figura 5 – Proteínas envolvidas na via canônica de sinalização de proliferação induzida pelas enzimas cinases MAPKs após ativação do receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR).

A mutação no inibidor 2A de enzima cinase dependente de ciclina (CDKN2A) é outra alteração oncogênica muito importante e com frequência de aproximadamente 50% nos casos de melanoma. Este gene codifica a proteína p16, uma proteína supressora de tumores, que atua através da inibição da enzima cinase dependente de ciclina 4 (CDK4) que controla o ciclo celular. A expressão de p16 mantém as células na fase G1 / S, o qual permite o reparo do DNA antes da replicação. Este oncogene codifica também a proteína p14 (ARF), uma isoforma que exerce sua atividade através da via da proteína p53. A p53 produz o bloqueio do ciclo celular nos pontos de controle nas fases G1 e G2 / M, o que pode resultar concomitantemente na reparação do DNA e/ou apoptose. No entanto, em células tumorais a inatividade destas proteínas contribui na instabilidade genética e eventos posteriores de formação de um melanoma maligno (Shannan et al., 2016).

1.3 Características imuno-histopatológicas dos melanomas

Morfologicamente os tumores de melanoma possuem características histológicas próprias comparáveis com outros tumores como carcinomas, tumores neuroendócrinos, sarcomas, linfomas e tumores de células germinativas. Estes apresentam um microambiente tumoral heterogêneo e subpopulações neoplásicas diferenciadas com características citomorfológicas variadas e arquitetura do microambiente tumoral dependente do grau de malignidade da doença. As células de melanoma podem ter uma morfologia romboide, fusiforme, abalonada, pleomórfica ou irregular, entre outras. O seu citoplasma pode conter inclusões, material fagocitado, depósitos de glicogênio, filamentos anelares de vimentina, vacúolos vazios (aparência pseudolipoblástica). Também, o núcleo pode ser central ou excêntrico, variavelmente hipercromático, pleomórfico ou multinucleado e com um ou mais de um nucléolo eosinofílico. No microambiente, a arquitetura tumoral pode apresentar estruturas pseudoglandulares, pseudofoliculares ou pseudopapilares. Também, mais infreqüentemente, pode-se observar infiltração de neutrófilos, células em mitose e células tumorais fagocitando outras células, embora este último seja ainda mais incomum (Banerjee, Harris, 2000; Ohsie et al., 2008).

A caracterização do perfil imunofenotípico por ensaios de imuno-histoquímica (IHC) é usada no diagnóstico e identificação do grau da malignidade desta doença. São usados tipicamente marcadores de diferenciação melanocítica, marcadores de proliferação celular, marcadores de imunomodulação e moléculas de sinalização intracitoplasmática (Banerjee, Harris, 2000). São parte do painel imuno-histoquímico marcadores negativos revelados com anticorpos contra as queratinas de baixo e alto peso molecular ou pancitoqueratinas, usadas como marcador geral de células epiteliais. Estas moléculas produzem coloração citoplasmática dos filamentos intermediários em células epiteliais normais e tumorais epidérmicas. Além disso, os primeiros marcadores positivos mais sensíveis e específicos são os marcadores de diferenciação neuroectodérmica denominados S100, HMB-45 e Melan-A. As proteínas S100 são uma família de baixo peso molecular com afinidade de ligação ao cálcio, com padrão citoplasmático e nuclear. Ela é expressa em

melanócitos, células da glia, condrócitos, células mioepiteliaes secretoras e em 98% dos melanomas. O metilbromuro de homatropina 45 (HMB-45) é um anticorpo que identifica uma proteína transmembrana de melanócitos (PMEL) mostrando padrão citoplasmático. A expressão é detecta em melanomas primários sendo menor em melanomas metastáticos. O Melan-A ou antígeno de melanoma reconhecível por células T1 (MART-1) é uma proteína transmembranana de diferenciação de melanócitos que se liga ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) para ser apresentada as células T citotóxicas. Ela está expressa em melanócitos, células da retina, do córtex suprarrenal, do ovário, células de Leydig, nevus melanocíticos e melanoma, com exceção do melanoma desmoplásmico e de células fusiformes. Outros marcadores de proliferação celular usados no estudo de melanoma são o Ki67 e as ciclinas A, B, C, D e E. O Ki67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular e expressa nas fases G1, S, G2 e M e ausente na fase Go ou quiescente do ciclo de proliferação celular. Durante a interfase ela se encontra no núcleo e na mitose se localiza na superfície dos cromossomos. Os marcadores da imunomodulação tumoral como HLA de classe I e classe II, e CD40 são expressos também expressos nos melanomas. Outras moléculas de vias de sinalização celular como via da fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K) e a fosfatase PTEN são reconhecidas como fatores de risco no melanoma (Banerjee, Harris, 2000; Ohsie et al., 2008).

1.4 Dermicidina

A dermicidina (DCD) é produto do gene localizado na banda q13 do cromossomo 12 (Schitteck et al., 2001; Porter et al., 2003). O gene DCD pode gerar três transcritos alternativos da dermicidina: DCD-1, DCD-2 e DCD-3. O transcrito DCD-1 contém 330 pares de bases e codifica a proteína dermicidina com 110 aminoácidos (Figura 6) e de aproximadamente 11 kDa (Lori et al., 2005; Lowrie et al., 2006).

Figura 6 – O gene *DCD*, sequência de aminoácidos e atividade dos seus produtos. Fonte: Adaptado de Stewart et al., 2001.

O gene foi identificado por Schitteck e colaboradores (2001) e também por Cunningham e colaboradores (2002) recebendo o nome peptídeo de evasão de sobrevivência difusível (DSEP). Historicamente, o primeiro produto putativo do gene foi identificado pelo nome fator de indução de proteólise (PIF), um peptídico de 3 kDa, o qual atua na forma glicosilada (Smith, Tisdale, 1993; Abe et al., 2004; Deans et al., 2006; Malczak et al., 2007). Estudos sobre a progressão da caquexia no catabolismo do músculo esquelético em camundongos portadores de adenocarcinoma MAC16 confirmaram a ação do

PIF na inibição da síntese proteica e o incremento da proteólise no músculo esquelético (Beck, Tisdale, 1987; Smith, Tisdale, 1993; Stewart et al., 2008).

Posteriormente, foi revelado que o PIF era um proteoglicano de 24 kDa cuja porção de carboidratos estava ligada a um peptídeo de 20 aminoácidos da N-terminal da proteína DCD. Este fator foi reconhecido como fator indutor de caquexia no plasma e urina de pacientes caquéticos portadores de câncer de pâncreas (Todorov et al., 1996). A DCD contém na porção N-terminal a sequência da proteica conhecida como peptídeo promotor de sobrevivência (Y-P30) (Cunningham et al., 1998; Landgraf et al., 2008; Mikhaylova et al., 2014). Este peptídeo pode atuar como regulador da resposta imune no resgate de neurônios da degeneração em células de retinoblastoma humano Y79 e em células do hipocampo HN 33.1 de linhagem murina. Os estudos *in vivo*, por exposição a peróxido de hidrogênio em neurônios corticais de ratos após de serem lesionados no córtex cerebral; a atividade protetora possivelmente se dá pela sua afinidade de ligação à calreticulina e pela sua atividade fosfatase. A expressão do Y-P30 pode estar relacionada com a depressão do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) e em consequência inibição da excitação do receptor e morte por excitotoxicidade dos neurônios (Cunningham et al., 1998).

Outro peptídeo derivado da porção C-terminal da DCD, nomeado DCD-1L, apresenta 47 aminoácidos e massa molecular de 4,7 kDa, e é gerado por atividade proteolítica da catepsina D. O DCD-1L foi descoberto no suor secretado pelas glândulas écrinas humanas pela sua atividade bactericida e fungicida. Portanto, a DCD exerce uma capacidade de modulação da defesa imune inata na pele (Schitteck et al., 2001; Sagawa et al., 2003; Steffen et al., 2005; Schitteck, 2012). A DCD e uma forma variante (DCD-SV) também foram identificadas na placenta humana, onde possivelmente se encontra formando dímeros ou oligômeros (Lee et al., 2007; Bancovik et al., 2015). A expressão restringida nesta etapa específica poderia implicar que esta DCD poderia promover a atividade antimicrobiana natural à placenta, protegendo o feto da invasão de microrganismos, reduzindo a morbidade e mortalidade relacionadas à gestação (Lee et al., 2007).

O possível papel da DCD na oncogênese de melanomas malignos ocorreu a partir de resultados em diversas investigações, onde se identificou um aumento significativo de transcrição do gene em nevos melanocíticos e várias linhagens celulares de melanoma (Hiptel et al., 2000; Rieg et al., 2004; Markovic, 2003). O nosso grupo usou o modelo de células de melanoma murino B16F10 (Fidler, Kripke, 1977) que crescem no camundongo singênico C57BL/6J para investigar o papel da DCD sobre o crescimento e metástases desta linhagem de melanoma (Garay, 2003). Inicialmente foram geradas linhagens de células B16 que superexpressavam o gene da DCD sob o controle do promotor de citomegalovírus (clone B16-DCD) e clones de células B16 controle (clone B16-pcDNA), que expressam o vetor pcDNA vazio. Os camundongos injetados por via intravenosa com células B16-DCD desenvolveram maior número de nódulos metastáticos nos pulmões, bem como metástase no fígado, rins e em outros órgãos. Estes camundongos exibiram perda progressiva de peso corporal (caquexia) e morte rápida (entre 15-20 dias pós-injeção) em relação aos camundongos injetados com células B16-pcDNA (Garay, 2003). A injeção de células B16-DCD por via subcutânea também resultou em tumores maiores, com tamanho superior ao obtido em tumores B16-pcDNA, no entanto, ambos os grupos apresentaram peso corporal semelhante e um aumento da sobrevivência de dois meses.

Para melhor exploração da atividade oncogênica da DCD, comparou-se o crescimento e resistência celular das células de melanoma humano G-361 e sublinhagens com expressão de shRNA (short hairpin RNA) que inibe constitutivamente a expressão de mRNA evitando a síntese da proteína DCD (Perez-Sosa, 2014; Sangiuliano, 2015). Observou-se que o crescimento da massa tumoral em camundongos BALB/c Nude foi significativamente reduzido em comparação ao crescimento tumoral em camundongos injetados com células G-361 controle. Mais importante, observou-se uma estabilização do crescimento e posteriormente uma ligeira diminuição dos tumores quando os animais iniciaram tratamento com anticorpos policlonais de coelho contra a DCD (Perez, Belizário, 2013; Perez-Sosa, 2014).

Os possíveis mecanismos moleculares e vias envolvidas na resposta biológica do melanoma foram revelados através de estudos comparativos de expressão de genes induzidos pelas células de melanoma humano G-361 selvagem (clone G-361-pLKO) e na sublinhagem G-361-IBC-I com expressão da DCD suprimida via RNAi (Perez-Sosa, 2014). A expressão global entre os clones G-361-pLKO e IBC-I usando o microarranjo Affymetrix 1.0 ST revelou 374 genes diferencialmente expressos (DEGs) ($p < 0,05$), sendo 162 genes induzidos e 212 reprimidos (Perez, Belizário, 2013; Perez-Sosa, 2014). A análise por ontologia gênica dos DEGs pelo software MetaCore revelou que a maioria dos genes induzidos (3-folds) pela redução da expressão da DCD estão envolvidos em funções e processos relacionados a organização de nucleossomos, empacotamento e regulação da cromatina, entre outros (Perez-Sosa, 2014). Observou-se também que os genes da via de sinalização APRIL/BAFF e fator de transcrição NF- κ B sofrem modulação após silenciamento do gene DCD nas células de melanoma G-361. Observou-se que os genes TRAF3 e calcineurina A foram regulados negativamente, enquanto os genes BAFF e APRIL foram regulados positivamente pela redução da DCD (Perez-Sosa, 2014).

Em seguida, avaliou-se a expressão da proteína DCD em amostras de tumores humanos depositados em microarranjo de tecido usando anticorpos específicos que reconhece a região C-terminal da DCD (Tissue Microarray, TMA). Neste estudo identificou-se alta e moderada expressão da proteína DCD em 101 amostras de melanoma (Sangiuliano, 2015). A expressão foi positiva em 47% dos casos, a coloração intensa na membrana em algumas amostras sugere que oligômeros de peptídeos de DCD distribuem-se na membrana celular. Porém, hoje sabemos que os peptídeos DCD (4,7 kDa) tem uma atividade bactericida e levam a lise de bactérias após a formação hexâmeros que se inserem na membrana formando um canal de membrana de alta condutância (Song et al., 2013). Todavia, ainda não se sabe se o mecanismo de sinalização molecular via um receptor de membrana poderia estar envolvido na função da DCD como um fator de crescimento e sobrevivência celular (Porter et al., 2003).

Em concordância com os nossos dados, uma investigação recente em uma coorte de pacientes com melanomas primários e metastáticos identificou

uma assinatura gênica que pode ser usada monitorar os estágios iniciais e avançados da doença (Burnner et al., 2013). A assinatura contém nove genes de predição de sobrevivência e metástase. São eles: queratina 9 (KRT9), gene da proteína 10 que contém o domínio BTB e da repetição de Kelch (KBTBD10, Kelch repeat and BTB domain-containing protein 10), o gene relacionado ao câncer esofágico 2 (ECRG2), o gene da proteína induzida por prolactina (PIP), o gene do membro 2 da família da secretoglobina 2A (SCGB2A2), o gene do membro 2 da família da secretoglobina 1D (SCGB1D2), o gene da proteína de colágeno alfa 6 VI (COL6A6), o gene do fator de transcrição 6 da família hes bHLH (HES6) e finalmente, o gene da dermicidina (DCD). Embora não sejam diretamente envolvidos no processo inicial de carcinogênese, todos os genes acima participam em processos relacionados ao desenvolvimento do microambiente tumoral que promove o crescimento e disseminação dos melanomas (Hawryluk, Tsao, 2015).

1.5 Farmacoterapia do melanoma

As opções de tratamento de pacientes portadores de melanoma dependem da graduação histológica e grau de diferenciação das células tumorais bem como o estadiamento clínico do paciente que varia de grau I a IV (Davies, Samuels, 2010). A primeira opção é a cirurgia, seguida de radioterapia local. Em muitos casos, os quimioterápicos são aplicados nos estados finais da doença, ou seja, na etapa III ou etapa de metástase regional, quando o tumor pode ter ou não ulcerações e se espalhado aos nódulos linfáticos do redor do tumor primário. Os quimioterápicos também são usados na etapa IV ou etapa de metástase distante, na qual o melanoma se disseminou aos linfonodos ou órgãos distantes como o pulmão, fígado ou cérebro (Compton, 2012). O tratamento quimioterápico está dirigido a evitar o crescimento e divisão das células cancerosas por apoptose.

Nos últimos anos, o diagnóstico e prognóstico da doença tem sido feito através de sequenciamento de DNA dos pacientes para identificar diversos genes mediadores da lesão melanocíticas que incluem a deleção do gene PTEN e CDKN2A, amplificações dos genes KIT (Tyrosine-Protein Kinase), MITF (Microphthalmia-associated transcription factor), TERC (Telomerase RNA component), CCND1, bem como mutações nos genes RAS e BRAF (Freedman

et al., 2011; Lawrence et al., 2014; Timar et al., 2010; Sullivan, Faherty, 2013). A terapia personalizada dos melanomas teve seu início com a aprovação pela “Food and Drug Administration” (FDA) do Zelboraf / vemurafenibe (PLX4032) em 2011, o primeiro fármaco que tem como alvo terapêutico a proteína BRAF^{V600E} mutante (Figura 7), uma MAPKKK efetora da via RAS / RAF / MEK / ERK (Concoran et al., 2012; Das-Thakur, Stuart, 2013; Sullivan, Faherty, 2013; Thurin, Marincola, 2014). No entanto, novas mutações nos genes das enzimas cinases envolvidas nesta via sinalização têm sido identificadas como causa de resistência aos inibidores de BRAF mutante (McCubrey et al., 2012; Solit, Rosen, 2013).

A mutação BRAF^{V600E} tem uma frequência de mais de 50% entre os casos de melanoma. A BRAF mutante tem atividade de cinase constitutiva o que causa uma hiperativação da via RAS / RAF / MEK / ERK (Hatzivassilou et al., 2013). O tratamento com vemurafenibe em pacientes portadores desta mutação tem uma resposta notavelmente eficaz, no entanto, a maioria dos pacientes apresenta resistência ao fármaco após 6-12 meses da remissão tumoral (Sullivan, Faherty, 2013; Sun et al., 2014). Esta resistência foi relacionada à reativação da via mediada pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, ErbB ou HER) que também ativa via das MAPKs. Não se sabe se expressão destes receptores contribui para a insensibilidade ao vemurafenibe em todos os tumores sensíveis, como foi demonstrado para o câncer colorretal de pacientes com a mutação BRAF^{V600E} (Corcoran et al., 2012; Sandri et al., 2016).

Mais recentemente notou-se que os pacientes portadores da mutação BRAF^{V600E} tratados com inibidores de BRAF ou em terapia combinada com inibidores de MEK apresentavam resistência causada por um aumento nos níveis de autofagia (Ma et al., 2014). Também, em linhagens celulares de melanoma BRAF^{V600E}, a inibição de BRAF ou a inibição conjunta de BRAF e MEK produziu autofagia citoprotetora. Em concordância, a inibição da autofagia potencializou a morte celular induzida pela inibição de BRAF mutante (Ma et al., 2014). Em nossos estudos utilizando a plataforma “Connectivity Map” mostramos que DCD pode promover a ativação da via PI3K / AKT / mTOR em células de câncer de mama conforme (Moreira et al., 2008; Belizário et al., 2016).

1.6 Vemurafenibe

O FDA aprovou o uso do vemurafenibe para o tratamento do melanoma no ano 2011, no ano seguinte o seu uso foi também aprovado pela Agência de Medicamentos Europeia (EMA). O princípio ativo foi inicialmente comercializado com o nome de Zelboraf pela indústria farmacêutica Plexxikon. O vemurafenibe é uma molécula de baixo peso molecular indicado como terapia para pacientes adultos com melanoma metastático, portadores da mutação BRAF^{V600E} em estadiamento III e IV. Estruturalmente, o fármaco é um azaindol com um grupo sulfonamida (Figura 7), cuja fórmula molecular é representada como C₂₃H₁₈ClF₂N₃O₃S e tem uma massa molecular de 489,93 g / mol, pKa entre 7,9 e 11,1 e coeficiente de partição em água de 3,0 e baixa solubilidade em água (< 0.0001 mg / mL). Vemurafenibe é comercializado como comprimido recoberto e deve ser administrado via oral na dose de 960 mg a cada 12 horas. O vemurafenibe provoca morte da célula tumoral por apoptose, interrompe a via de sinalização da MAPK evitando a ativação da MEK cinase por inibição do BRAF^{V600E} monomérico, finalmente interferindo na regulação da proliferação, diferenciação celular, transcrição e desenvolvimento celular (Sullivan, Faherty, 2013; Sun et al., 2014).

Dados farmacocinéticos mostram um tempo de absorção máximo de 4 horas, biodisponibilidade total ainda desconhecida devido à limitada solubilidade no pH fisiológico (0.01 – 0.1 µg / mL), concentração plasmática máxima entre 4.8 ± 3.3 µg / mL, volume de distribuição estimado de aproximadamente 90 L, ligação as proteínas plasmáticas > 99%. O fármaco é metabolizado no fígado, sendo substrato do citocromo 3A4 (CYP3A4) e logo é excretado via renal ou hepática, apresenta um tempo de vida meia de 56 horas. Estudos de interação farmacocinética *in vitro* mostraram a capacidade do vemurafenibe de inibir CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 e a glicoproteína P (Sullivan, Faherty, 2013; Sun et al., 2014).

Os efeitos adversos mais comuns são a fotossensibilidade, formação de neoplasias benignas como o carcinoma de células escamosas cutâneas, queratose seborreica e papiloma de pele. O vemurafenibe também induz *rash* cutâneo, desordem do apetite, desordem no sistema nervoso como dor de cabeça, complicações gastrointestinais como diarreia, vômito, náuseas e constipação. O sistema musculoesquelético e conectivo pode ser afetado por

artralgia, mialgia e artrites. Ao nível cardiovascular está associado com a prolongação da repolarização cardíaca (QT) ou arritmias menos frequentemente, pode produzir aumento de creatinina fosfocinase, bilirrubina, lipase, aumentar hemorragias intraventriculares, pneumonia e pneumotórax, pode provocar desordem no sistema sanguíneo como neutropenia, trombocitopenia e menor contagem de glóbulos brancos (Sullivan, Faherty, 2013; Sun et al., 2014).

Figura 7 – Estrutura molecular da vemurafenibe e suas características físico-químicas.

1.7 Resistência ao tratamento inibitório de BRAF^{V600E}

O desenvolvimento de resistência ao tratamento inibitório do BRAF^{V600E} na terapia do melanoma com vemurafenibe se apresenta aproximadamente em 40% dos casos (Sullivan, Faherty, 2013; Sun et al., 2014). O mecanismo pode estar relacionado a diversos fatores intrínsecos ou se desenvolver (resistência adquirida) a partir da administração do inibidor (Figura 8). A resistência intrínseca após pré-tratamento inclui a expressão de reguladores do ciclo celular, como mutações na ciclina D1 e mutações no BRAF que afetam a afinidade do inibidor. As mutações em proteínas das vias de sinalização paralela, por exemplo, no PTEN e a produção estromal do fator de crescimento do hepatócito (HGF) capaz de ativar o EGFR por via alostérica são também descritas em vários artigos de literatura. Em estudos recentes em várias linhagens celulares se observou que mutações no BRAF e amplificações da

ciclina D1 (CCND1) conferem uma alta resistência ao tratamento inibitório na via das MAPKKK (Lito et al., 2013; Sullivan, Flaherty, 2013).

Figura 8 – Vias intrínsecas e adquiridas para desenvolvimento de resistência a inibição da BRAF^{V600E} pelo vemurafenibe. Fonte: Adaptado de Sullivan, Flaherty, 2013.

A resistência adquirida ocorre por duas vias: uma independente da via RAS / RAF / MEK / ERK, e uma segunda via que está relacionada à reativação das enzimas cinases ERKs. Os biomarcadores associados com a via independente incluem a super-expressão de receptores de tirosina cinases (RTKs) como o receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR β) e o receptor 1 do fator de crescimento tipo insulina (IGF-1R), ambos associados a ativação da via PI3K / AKT / mTOR. A resistência relacionada à via das MAPKs é primeiramente mediada pela formação de dímeros de RAF que reativam a via e que não são inibidos pela molécula de vemurafenibe. As outras formas de resistência estão relacionadas com as mutações no RAS, a super-expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a ativação do MEK pela cinase COT (MAPKKK), e por mutações no MEK que

ativam diretamente as enzimas cinases ERKs, mantendo a proliferação, sobrevivência e crescimento celular (Lito et al., 2013; Sullivan, Flaherty, 2013).

1.8 Caquexia no câncer

A caquexia constitui em uma síndrome complexa caracterizada pela perda de peso devido consumo de tecido adiposo e massa muscular esquelética e cardíaca, em consequência, um aumento tanto na fadiga física quanto na fadiga mental dos pacientes com câncer (Tisdale, 2009). O estado de desnutrição crescente no paciente não é simplesmente devido a anorexia ou a falta de ingestão de alimentos. A perda de massa muscular e consumo de proteínas mio-fibrilares é uma característica diferencial da doença (Tisdale, 2009). A erosão muscular não é acompanhada de uma diminuição nas reservas proteicas viscerais ou de massa hepática, mas sim por uma complexa alteração nos processos de degradação de proteínas musculares pela ativação de enzimas proteolíticas como caspases e calpaínas e degradação mediada pelos proteossomas (Garay, 2005, Belizario et al., 2016). Hoje, sabemos que existe uma renovação de células musculares a partir de células-tronco mioblásticas, denominadas de células satélites, e esta renovação encontra-se comprometida durante a caquexia neoplásica (Belizário et al., 2016).

Todorov e colaboradores (1997) relatam que os tumores indutores de caquexia aumentam a produção de PIF. Nos nossos estudos iniciais, se determinou o nível de bioatividade do PIF nas amostras de sangue de paciente com câncer cuja perda de peso corporal foi maior que 10% (Belizário et al., 1991). A possível relação causal entre a produção deste fator de indução de proteólise muscular e a perda de peso corporal do paciente ainda continua em investigação (Tisdale, 2009). Por outro lado, ainda não existem evidências bioquímicas que comprovem que PIF é um subproduto da DCD (Schitteck, 2012).

1.9 Autofagia no câncer

A autofagia é considerada um processo de sobrevivência celular em resposta a privação de nutrientes e estresse por hipóxia e que é essencial para manutenção da integridade celular e genômica (Mah, Ryan, 2012). Durante o processo uma vesícula de membrana dupla denominada autofagossoma capta porções do citosol (incluindo organelas) e apresenta ao lisossomo para serem digeridas formando o autolisossomo. Os mecanismos moleculares da autofagia foram preservados ao longo do tempo, existindo no genoma de diversos organismos, um conjunto de genes, primeiramente descritos em leveduras e denominados de Atg (autophagy). A LC3 é a única proteína Atg que se encontra em células eucariontes associada ao autofagossoma maduro. Desta forma, a quantificação da LC3-II, a forma conjugada com a fosfatidil etanolamina, é normalmente utilizada para estimar a abundância de autofagossomas. Após a fusão do autofagossoma com o lisossoma, esta proteína é degradada.

A autofagia e a apoptose são dois mecanismos distintos, ao nível morfológico e molecular, mas que estão interligados pelas vias de sinalização compartilhadas. Morte celular autofágica é um tipo de morte acompanhado por intensa vacuolização citoplasmática, aumento da granulosidade celular com fragmentação celular e formação de vacúolos autofágicos. A apoptose é caracterizada pela fragmentação nuclear, contração do volume nuclear e celular, *blebbing* da membrana plasmática, entre outros eventos. Porém, a autofagia é também reconhecida por induzir a proteção de morte celular. A Beclina é uma proteína que interage e inativa o efeito anti-apoptótico de Bcl2. Em condições habituais, a beclina é inibida quando ligada pela Bcl-2, no entanto, para ocorrer autofagia é necessário dar-se a dissociação entre Beclina e Bcl-2 (Tsujimoto, Shimizu, 2005). Outros membros da família de proteínas anti- e pro-apoptóticas da família Bcl-2 controlam as vias de autofagia e apoptose (Tsujimoto, Shimizu, 2005).

O estudo da regulação molecular da autofagia avançou com a identificação da proteína TOR ("Target of Rapamycin") uma serina - treonina cinase, pertencente ao grupo das PI3K. A rapamicina sendo inibidor da mTOR, atua como indutor da autofagia. Por outro lado, as enzimas da família de serina

- treonina cinases ativadas por receptores de fatores de crescimento ERK1 e ERK2 envolvidas na via de sinalização RAS-RAF1-MEK podem também atuar como indutoras de autofagia em modelos de linhagens celulares (Cagnol, Chambard, 2010).

Recentemente descobriu-se que autofagia é um mecanismo de resistência exibido por células cancerosas sob estresse metabólico e terapêutico, e isto tem despertado interesse pelo desenvolvimento e exploração de proteínas reguladoras da autofagia como alvo terapêutico para tratamento do câncer (Amaravadi et al., 2011).

1.10 Cloroquina

A cloroquina (Figura 9) é um conhecido antimalárico que funciona como um agente lisossomotrópico livremente permeável que entra no lisossomo, onde é desprotonado e aprisionado na forma de base diácídica (Pascolo, 2016). Esta droga incrementa a basicidade no lisossomo por sequestro dos íons livres de hidrogênio necessários para manter o pH ácido interno. Isto inativa as proteases e hidrolases lisossomais e inibe a fase final do processo da autofagia.

Cloroquina

Fórmula molecular:

Massa molecular:

319.87 g / mol

pKa:

10,1

Figura 9 – Estrutura molecular da molécula da cloroquina e suas características físico-químicas.

Vários agentes químicos podem inibir a autofagia, sendo a cloroquina, e seus derivados, os mais utilizados para este propósito. Demonstrou-se que a deleção de genes relacionados com a autofagia não alterou o efeito da cloroquina na viabilidade celular, constatando que a capacidade de inibir a

autofagia é separada dos efeitos letais dos compostos (Goodall et al., 2014; Pascolo, 2016). Em tumores do sistema nervoso central com células portadoras de BRAF^{V600E} encontraram-se altas taxas de autofagia induzida; estas células são sensíveis à inibição genética e farmacológica da autofagia, além de exibir sinergismo quando combinado com o inibidor de BRAF mutante, o vemurafenibe, ou também com outros quimioterápicos usados no tratamento dos cânceres (Goodall et al., 2014; Levy et al., 2014). Este papel da cloroquina como um indutor de sensibilidade a agentes quimioterápicos tem merecido grande atenção e interesse clínico devido ao seu baixo custo e benefícios neoadjuvantes amplamente conhecidos na prática clínica (Amaravadi et al., 2011; Pascolo, 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Avaliar a influência da dermicidina no efeitos terapêuticos de vemurafenibe e cloroquina no crescimento de células de melanoma G-361 em cultura celular e em camundongos imunodeficientes.

2.2 Objetivos específicos:

- Desenvolver protocolos para o tratamento *in vitro* e *in vivo* de células da linhagem de melanoma G-361 utilizando vemurafenibe, um inibidor da proteína mutante BRAF^{V600E}, e cloroquina, um inibidor de autofagia;
- Investigar o papel da proteína Dermicidina na geração de clones resistentes à terapia;
- Investigar as alterações morfológicas teciduais e celulares e a expressão de biomarcadores de resistência à morte celular induzida pela terapia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ensaios da atividade citotóxica do vemurafenibe e cloroquina *in vitro*

Neste estudo utilizou-se a linhagem de melanoma humano G-361 (ATCC CRL 1424) obtida da ATCC (American Type Culture Collection). As células foram cultivadas em garrafas plásticas em meio de cultura DMEM complementado com glutamina 2 mM e soro fetal bovino (FBS) 10%, antibióticos 1% (penicilina e estreptomicina) e fungizona (Amphotericin B) 250 µg/mL. As culturas confluentes foram repicadas semanalmente após tratamento com solução de tripsina/EDTA e diluídas na proporção de 1:3 a 1:6. A cada ensaio, as células foram semeadas em placas de 24 e 96 poços, em uma densidade de $1-2 \times 10^4$ células / poço, em seguida mantidas em estufa com CO₂ 5% e a 37 °C por 16-24 horas.

Os ensaios de citotoxicidade foram feitos em triplicatas. Em cada poço foi adicionado uma dose de vemurafenibe nas concentrações de 2 µM, 1 µM, 0,5 µM e 0,25 µM., cloroquina nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM e 12,5 µM, ou com a combinação de ambos fármacos. O grupo controle foi tratado com veículo DMSO 0.01%. As placas foram incubadas por 16-24 horas.

3.1.1 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A viabilidade celular foi analisada através da redução do MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) em uma concentração final na concentração final 5 µM. O MTT quando exposto à células viáveis é reduzido a cristais de formazan pela ação das enzimas desidrogenases da cadeia respiratória das mitocôndrias. Assim, o resultado reflete o estado funcional da cadeia respiratória. A quantificação do formazan foi realizada através da leitura espectrofotométrica dos cristais solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), no comprimento de onda de 570 nm.

3.1.2 Detecção de núcleos apoptóticos por fluorescência com coloração DAPI

Células de melanoma G-361 foram tratadas com vemurafenibe 2 μ M, cloroquina 50 μ M e com a combinação destas drogas. Nos ensaios para a detecção de núcleos apoptóticos, aproximadamente $1-2 \times 10^4$ células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares no fundo. Após um dia de cultivo, as células foram expostas aos tratamentos indicados por 6 horas. Em seguida, procederam-se duas lavagens com PBS a temperatura ambiente e as células foram fixadas com metanol absoluto por 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 5 vezes com PBS e cobertas com TRITON 0,5% em PBS durante 30 minutos, depois lavadas por 5 vezes com PBS. Em seguida, adicionou-se 6 μ L de faloidina conjugada a FITC (1:300) e as lamínulas foram então encobertas com pedaço de Parafilm e incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após a incubação as células foram lavadas por 5 vezes com PBS. Em seguida, colocou-se 5 μ L de meio de montagem Vectashield® e 2 μ L de DAPI (1:5000). A lamínula foi invertida em cima de uma lâmina de vidro e selada com esmalte, e posteriormente as lâminas foram analisadas ao microscópio de fluorescência. As imagens digitais foram microfotografadas no microscópio digital Axio Scan Z1 (Zeiss).

3.1.3 Ensaio de atividade da β -Galactosidase de células senescentes

Células de melanoma G-361 ($1-2 \times 10^4$ células) foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares no fundo e cultivadas por um ou dois dias. Posteriormente, foram adicionadas doses de vemurafenibe, cloroquina ou a combinação de ambas as drogas, e as células incubadas por 6-8 horas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS a temperatura ambiente e fixadas com metanol absoluto por 5 minutos. Depois disso, adicionou-se em cada poço 1-2 mL da solução de coloração X-Gal preparada conforme Tabela 1. Em seguida, a placa foi selada com parafilme e incubada em estufa à 37 °C por 16-24 horas na ausência de CO₂.

Após a incubação, as lamínulas foram montadas em lâminas com glicerol 70% e seladas com esmalte. As imagens digitais em 10 a 20 campos foram obtidas com microscópio digital EVOS (Thermo Fisher Scientific). Foram consideradas células senescentes as células que se apresentavam coloridas em azul ao redor do núcleo e citoplasma expandido e transparente.

Tabela 1 - Solução de coloração X-Gal para ensaio de senescência celular (volumen 20 ml)

Soluções	Volume	Concentração Final
X-gal 20 mg/mL em dimetilformamida	1 mL	1 mg/mL
Ácido cítrico 0,2 M em Na ₂ HPO ₄ , pH 6	4 mL	40 mM
Ferrocianeto de potássio 100 mM	1 mL	5 mM
Ferricianeto de potássio 100 mM	1 mL	5 mM
Cloreto de sódio 5 M	0,6 mL	150 mM
Cloreto de magnésio 1 M	40 µL	2 mM
Água Milli-q	13,4 mL	

3.2 Ensaios da atividade antitumoral da vemurafenibe e cloroquina in vivo

A aprovação do protocolo experimental para a manipulação dos camundongos foi deferida pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas / USP (CEUA-ICB), conforme registro número 25, folha 29 do livro 03.

Para a realização dos estudos de atividade antitumoral das drogas vemurafenibe e cloroquina in vivo foram desenhados dois protocolos experimentais. O primeiro (Figura 10) foi desenhado para avaliar se a expressão de dermicidina poderia afetar a resposta das células de melanoma humano da linhagem G-361 durante o tratamento com vemurafenibe (50 mg / kg / 24 h / 21 dias) durante o crescimento tumoral em camundongos BALB/c *Nude*

As sublinhagens de células G-361-pLKO e G-361-IBC I foram selecionadas previamente conforme descrito (Moreira et al., 2007). Resumidamente, a sublinhagem denominada de G-361-pLKO (vetor vazio) com expressão positiva de DCD e a sublinhagem G-361-IBC I, que expressa o shRNA contra a DCD (denominada DCD negativa) foram obtidas através de ensaios de transdução com lentivirus geneticamente modificados para integração no genoma de células-alvos conforme descrito em detalhes (Moreira et al., 2007). A seleção foi realizada por tratamento com puromicina (antibiótico) durante 10-60 dias. Somente colônias positivas que expressavam constitutivamente o shRNA para uma das três regiões específicas do RNAm do *DCD* foram selecionadas e expandidas. Os grupos de experimentação G-361-pLKO são constituídos de células expressando DCD, enquanto os grupos IBC I têm a expressão reduzida da DCD devido a expressão constitutiva do shRNA (RNAi).

Figura 10 - Esquema experimental do ensaio *in vivo* para avaliar o efeito da expressão da dermicidina na resposta ao tratamento com vemurafenibe em camundongos BALB/c Nude xenoinxertados com melanoma G-361.

No primeiro grupo de estudo foram utilizados 4-5 camundongos machos e/ou fêmeas, pesando entre 20 - 25 gramas com 90 - 120 dias de idade. Os

animais foram mantidos no biotério de experimentação em animais imunodeficientes do Instituto de Ciências Biomédicas (sala 332), nas condições adequadas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração. Os ensaios de xenotransplante foram realizados mediante injeções de aproximadamente 1×10^6 células viáveis da linhagem de melanoma G-361pLKO e G-361 IBC-I misturadas com 100 µL de Matrigel (BD Biosciences). As células foram injetadas no dorso dos camundongos tanto no flanco direito quanto no flanco esquerdo. Os animais foram observados diariamente quanto a registrando-se o peso e volume tumoral. Os camundongos do grupo *Negativo - Sentinela* receberam injeção do veículo (100 µL de Matrigel) no dorso esquerdo e direito. Estes animais foram tratados com o veículo da preparação de vemurafenibe (hidroxipropilcelulose 2%, pH 4) por gavagem durante 21 dias.

Quando os tumores atingiam um volume de aproximadamente 100 mm³, os animais passaram a receber diariamente durante 21 dias uma dose de vemurafenibe 50 mg / Kg / 24 h por gavagem. Os camundongos do grupo controle receberam hidroxipropilcelulose 2%, pH 4, por gavagem.

A partir dos resultados obtidos com o grupo acima, foi desenhado o segundo grupo experimental complementar. No grupo experimental 2 foram utilizados de 4-5 camundongos Balb/c NUDE (machos ou fêmeas), de aproximadamente 25 gramas e 90-120 dias de idade. Os animais foram mantidos nas condições adequadas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração. Aproximadamente $1-2 \times 10^6$ células viáveis de melanoma G-361 (G-361-pLKO, DCD positivo) em 100 µL de Matrigel (BD Biosciences) foram injetadas no dorso esquerdo e direito de cada camundongos. Este grupo foi tratado com a combinação das drogas vemurafenibe (50 mg / kg / 24 h / 21 dias) e cloroquina (30 mg / kg / 24 h / 21 dias) e vemurafenibe (50 mg / kg / 24 h / 21 dias) e cloroquina (30 mg / kg / 72 h / 21 dias). A cloroquina foi administrada duas horas após a administração de vemurafenibe para evitar aumento no pH gastrintestinal e que pudesse diminuir a absorção deste inibidor de BRAF^{V600E}. Os animais foram observados diariamente registrando-se o peso e volume tumoral. O grupo Controle recebeu o veículo de vemurafenibe (hidroxipropilcelulose 2%, pH 4) por gavagem diariamente por 21 dias.

Figura 11 - Esquema experimental 2 para ensaio *in vivo* de avaliação do efeito antitumoral da terapia combinada com vemurafenibe e cloroquina em camundongos BALB/c *Nude* xenoenxertados com células de melanoma G-361.

Um terceiro grupo foi criado (Figura 12) para avaliar a cinética de crescimento tumoral de células do melanoma G-361 em camundongos BALB/c *Nude* e camundongos NOD/scid/IL2rg null. Em ambos os grupos, foram xenotransplantados 1×10^6 células viáveis em 100 μ L de Matrigel® nos flancos direito e esquerdo de cada animal. Os camundongos do grupo *pLKO – Controle* receberam células da sublinhagem G-361-pLKO e DCD positiva e os camundongos dos grupos *IBC I – Controle* as células da sublinhagem G-361-IBC-I e DCD negativa ou reduzida devido a expressão shRNA contra a DCD.

Figura 12 - Esquema experimental 3 para ensaio *in vivo* de avaliação da cinética de crescimento tumoral de células de melanoma G-361-pLKO e G-361-IBC-1 nos camundongos de BALB/c *Nude* e camundongos NOD/scid/IL2rg null.

3.2.1 Monitoramento de variação de peso corporal

Os pesos dos animais de cada grupo foram monitorados diariamente desde o primeiro dia em que foram xenoenxertados até o dia em que foram eutanasiados. Os pesos corpóreos de cada camundongo ocorreram nos dias 1º, 7º, 14º e 21º após iniciado o respectivo tratamento em cada grupo. No grupo Controle foram realizadas coletas de peso nos dias 1º, 7º, 14º e 21º quando os camundongos apresentassem tumores de no mínimo 100 mm³. O grupo *Negativo - sentinela* também foi monitorado nos mesmos dias em que foram examinados e realizadas a pesagem dos animais do grupo Controle.

3.2.2 Monitoramento do crescimento tumoral

O crescimento da massa tumoral em cada camundongo foi acompanhado diariamente desde a detecção de um tumor perceptível de volume inicial entre 10 - 20 mm³. O volume tumoral foi obtido através da medida da largura e comprimento da massa visível de cada tumor utilizando-se

um paquímetro. O cálculo para obtenção do volume final foi feito pela seguinte fórmula: volume do tumor = $1/2$ (comprimento x largura²), conforme descrito (Jensen et al., 2008).

3.2.3 Coleta de amostras biológicas

No final do tratamento, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (100 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg) e preparados para a coleta de amostras biológicas. Primeiramente foram retirados os tumores, os quais foram lavados em tampão fosfato-salino (PBS, 0.1 M a pH 7), pesados e depois divididos em partes. Uma parte foi fixada em paraformolaldeído (PFA 2%, pH 7.5) ou em solução de formaldeído 10% tamponado, pH 7.0. A terceira parte do tumor foi congelada a -80 °C para análises bioquímicas. Em alguns tumores de cada grupo uma quarta parte foi reservada para obtenção de clones celulares. Para tanto, os fragmentos de tecido tumoral foram desagregados e picotados com tesoura e tratados com uma solução de tripsina 0,05% / EDTA 0,02%. As células foram filtradas através de uma peneira de corte de 70 μ M (Cell Strainer, BD Falcon) e lavadas por centrifugação. Em seguida, as células foram suspendidas meio de cultura (RPMI 10% SFB) e semeadas em placas de culturas. Os clones que cresceram em cultura foram expandidos e congelados em solução de meio de cultura contendo DMSO 10% e SFB 30%, e mantidas em tubos de congelamento em nitrogênio líquido para análises posteriores.

As amostras de sangue (20-100 μ l) de sangue periférico foram coletadas por punção cardíaca e analisadas imediatamente no contador hematológico Genius KT 6200 VET (China). Os dados globais obtidos referentes ao número de linfócitos (LYM%), células com tamanho médio (MID%), neutrófilos (NEUT%), glóbulos brancos (WBC) e eritrócitos (RBC) foram expressos em unidades $\times 10^3$ / μ L de sangue.

Em seguida, foram feitas as dissecções e coletas dos seguintes órgãos: coração, fígado, rins, baço e o músculo *gastrocnemius* da pata traseira. Após lavagem em solução PBS e secagem em papel toalha, os órgãos foram pesados e fixados em tampão PBS 0.1 M e PFA 2% ou formaldeído tamponado

à 10%. Uma parte de cada de órgão, ou tecido, foi armazenada à -80 °C para análises bioquímicas posteriores.

3.3 Análises histopatológicas

3.3.1 *Inclusão em parafina*

Amostras de órgãos e tecidos fixados conforme descrito acima foram submetidos a seguintes etapas: desidratação, diafanização e impregnação. Para desidratar as amostras foram realizadas duas lavagens em etanol 70%, duas lavagens em etanol 95%, e quatro em etanol 100%, 30 minutos cada. Para a diafanização, seguiu-se com três banhos de xilol, sendo cada banho de 30 minutos. Ao final, as amostras foram impregnadas com dois banhos em parafina líquida (Paraplast Plus) a 60 °C por 1 hora cada. Uma vez impregnado o material foi colocado em pequenos recipientes contendo parafina fundida, deixando-se endurecer para a solidificação dos blocos. Cortes transversais e longitudinais de 4 µm foram colhidos em lâminas histológicas tratadas para estudo de coloração com Hematoxilina & Eosina (HE) ou ensaios de imunohistoquímica.

3.3.2 *Coloração Hematoxilina & Eosina*

Em uma primeira fase, as lâminas foram imersas em xilol, e passados por dois banhos 30 e 15 minutos. Em seguida, os cortes são reidratados em cadeia descendente de etanol: três banhos em álcool absoluto por 3 minutos cada, um banho de 3 min em álcool de 95%, 90%, 85%, 80%, e um banho de 5 minutos em uma solução de hidróxido de amônio 10% em etanol finalmente foram lavados em água destilada por 5 minutos. Após isto, as lâminas foram coradas em Hematoxilina de Mayer por 15 minutos e lavados em água corrente. Em seguida, elas foram mergulhadas em carbonato de Lítio (saturado) por 5 minutos, logo após em solução alcoólica de Eosina por 1 minuto. Terminada a coloração, as lâminas foram desidratadas em escala crescente de etanol, iniciando com etanol de 70%, de 90%, de 100% e xilol, duas vezes cada por 5 minutos. As lâminas foram finalmente emergidas em

solução de montagem, contendo hidrocarboneto aromático policíclico (Tissue-Tek®) e secadas por 24 horas.

3.4 Análise imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHC) é uma técnica baseada na ligação específica de um anticorpo geralmente uma imunoglobulina G (IgG) em um epítopo presente em uma proteína ou peptídeo tecidual. Os complexos formados são visualizados com substâncias cromógenas visíveis ou fluorescentes ao microscópio. As moléculas que conferem esta visibilidade podem ser fluorocromos ou produtos de substratos químicos de reações enzimáticas pela enzima peroxidase ou fosfatase, que são conjugadas diretamente com o anticorpo primário ou anticorpo secundário, sendo as reações conhecidas como o método direto e indireto, respetivamente. Em geral, a enzima peroxidase *horseradish* (HRP) que oxida a diaminobenzidina (DAB) produzindo uma coloração marrom ou amarelada é utilizada para detectar reação positiva de interação anticorpo-antígeno.

Neste estudo, foram realizados vários ensaios de IHC para avaliar a expressão de biomarcadores e antígenos específicos expressos em células G-361 e tumores obtidos por xenotransplante em camundongos. Os ensaios foram padronizados para cada anticorpo utilizando-se como controle positivo amostras de carcinomas humanos, pele e nevos melanocíticos (Tabela 2).

Primeiramente, os blocos de tecido tumoral foram colocados em Micrótopo rotativo (Leica Biosystem) que foi então ajustado para obtenção de cortes com espessura de 4 ou 10 µm. Os cortes de cada amostra foram depositados em lâminas que em seguida foram desparafinizados em banhos de xilol de 30 e 15 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol: três banhos em álcool absoluto por 3 minutos cada, um banho de 3 min em álcool de 95%, 90%, 85%, 80%, e um banho de 5 minutos em uma solução de hidróxido de amônio 10% em etanol. Finalmente as lâminas foram lavadas com dois banhos em água destilada por 5 minutos. Para evitar o choque térmico na recuperação antigênica, as amostras foram previamente mergulhadas em água destilada quente.

Nos ensaios de recuperação antigênica foram utilizados dois protocolos: aquecimento em banho-maria e em forno de micro-ondas. No primeiro, os cortes foram incubados por 30 ou 60 minutos a 95 °C em banho-maria nos seus respectivos tampões de recuperação pré-aquecidos (Tabela 1). No segundo, as lâminas foram emersas em solução de recuperação e colocadas em uma Becker com gelo o qual foi submetido a 5 ciclos de 2 minutos no micro-ondas (Potência 100W). A cada ciclo foi substituindo o gelo derretido por gelo picado.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com solução tampão por três vezes em intervalos de 5 minutos. Em seguida foi feito o bloqueio da peroxidase endógena por incubação das amostras em uma solução de metanol e peróxido de hidrogênio (1:1). Os cortes foram incubados em dois tempos de 15 minutos. Após isto, se procedeu com a lavagem dos cortes com três banhos de 5 minutos em tampão Tris-HCl ou TBST (0.1% Tween-20), pH 7.6. Na sequência, se realizou o bloqueio de sítios inespecíficos por incubação com BSA ou solução de bloqueio (Spring Kit) por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida. Os tecidos foram embebidos com 25 µL do anticorpo primário e cobertos com pequenos pedaços de parafilme e incubados por 16-24 horas a 4 °C na geladeira. Ao final as lâminas foram lavadas em três banhos com solução tampão por 5 a 10 minutos.

A revelação foi realizada com a aplicação de 25 µL do anticorpo secundário, “EnVision system - HRP” do laboratório Agilent Technologies, Dako (Santa Clara, CA, USA). O tempo de incubação foi 1 a 3 horas. Em seguida, os cortes foram incubados por 5-10 minutos com diaminobenzidina, “DAB chromogen” diluído em “DAB Substrate” (1:50). Após a revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos e na sequência contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 5 minutos. Após isto, na etapa de desidratação dos cortes, as lâminas foram mergulhadas por alguns segundos em bateria de álcool de 70, 75 e 80%, por 3 minutos em álcool de 85%, 90% e 95%, e por fim, três vezes em álcool de 100% por 3 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram diafinizados em xilol em dois banhos de duração de 3 a 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram montadas para as análises por microscopia.

Tabela 2 - Lista de anticorpos utilizados nos ensaios de marcação por imuno-histoquímica.

Marcador	Clone	Fonte	Diluição	Tampão de recuperação	Controle positivo
Citoqueratinas	AE1/AE3	DAKO	1:50	Ác. Cítrico-HCl pH 6	Pele humana
DCD	A-20	ABGENT	1:50	Ác. Cítrico-HCl pH 6	Melanoma
EGFR	E30	DAKO	1:50	TRIS-EDTA pH 9	Carcinoma
HMB45	M0634	DAKO	1:50	Ác. Cítrico-HCl pH 6	Nevos
Melan-A	A103	DAKO	1:500	Ác. Cítrico-HCl pH 6	Nevos
S100	Policlonal	DAKO	1:700	Sem tratamento	Nevos

3.5 Análise microscópica

Para análise dos padrões histológicos e morfológicos dos cortes de tecidos e órgãos foram obtidas micrografias digitalizadas em um microscópio óptico digital Axio Scann Z1 (Zeiss, Alemanha). Os exames de fluorescência e imunofluorescência foram realizados em microscópios de fluorescência Olympus BX40 e microscópio Confocal Zeiss LSM510.

3.6 Análises Estatísticas

Os dados apresentados foram comparados entre si pelo teste *t* Student e por análise de variância unidirecional (ANOVA). As comparações múltiplas entre os grupos de tratamento e os controles foram avaliadas utilizando o teste de Dunnett. Cada resultado foi considerado significativo quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas com o programa estatístico *GraphPad Prism 6* (San Diego, CA, USA)

4 RESULTADOS

4.1 Atividade citotóxica da vemurafenibe e cloroquina *in vitro*.

4.1.1 Ensaio de MTT

A figura 13 mostra os resultados de viabilidade celular de células da linhagem de melanoma G-361 tratadas por 24 horas com vemurafenibe 2 μM , ou com cloroquina 100 μM e 50 μM . Em ambos os tratamentos observou-se uma diminuição de aproximadamente 50% da viabilidade celular. Também se obteve uma diminuição significativa quando as células foram tratadas com cloroquina 25 μM . Doses de vemurafenibe 1 μM ou menores não produziram diminuição da viabilidade celular (Figura 13).

Na figura 14 são mostrados os resultados dos tratamentos com as combinações de drogas e doses. Cloroquina 50 μM provocou a diminuição de aproximadamente 50% na viabilidade celular quando combinada com vemurafenibe 0,5 μM , sendo ambas concentrações menores a aquelas que produziram o mesmo efeito quando administradas individualmente.

Figura 13 - Viabilidade celular de células da linhagem G-361 após tratamento com vemurafenibe (A) e cloroquina (B) nas doses indicadas. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Figura 14 - Viabilidade celular de células da linhagem G-361 após tratamento combinado com vemurafenibe e cloroquina nas doses indicadas. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0.001.

4.1.2 Ensaio de núcleos apoptóticos por coloração com DAPI

Segundo os dados apresentados na figura 15, a combinação de vemurafenibe 2 μ M com cloroquina 50 μ M produziu a maior porcentagem de núcleos apoptóticos em comparação ao tratamento isolado com estas drogas.

Figura 15 - Quantificação de apoptose em células de melanoma G-361 tratadas com vemurafenibe, cloroquina e a combinação de ambas nas concentrações indicadas. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

A figura 16 mostra imagens representativas de cada grupo analisado, evidenciando um aumento discreto de apoptose nos grupos com apenas um fármaco e um incremento maior no grupo após o tratamento com dois fármacos combinado. As imagens são apresentadas em superposição da fluorescência do núcleo marcado com DAPI e citoesqueleto de actina do citoplasma marcada com faloidina-FITC, pode-se observar o empilhamento característico das células e os núcleos irregulares de grande tamanho. As setas mostram os núcleos marcados com DAPI destacando a cromatina fragmentada e condensada típico da apoptose e núcleos com cromossomos perfilados nos polos indicando o processo mitose (metáfase).

Figura 16 - Imagens representativas de núcleos fragmentados típicos das células apoptóticas nas populações de células de melanoma G-361 tratadas com vemurafenibe, cloroquina ou combinação de ambas nas doses indicadas, após 6 horas de incubação. As setas vermelhas indicam núcleos apoptóticos fragmentados. As setas amarelas indicam núcleos em mitose. Coloração em azul, cromatina nuclear corada com DAPI; coloração em verde, actina do citoesqueleto, detecção com foloidina-FITC.

4.1.3 A atividade da β -Galactosidase associada a senescência celular

A Figura 17 apresenta graficamente a variação no número de células positivas para a β -galactosidase após exposição das células de melanoma G-361 a vemurafenibe e cloroquina. Nota-se um aumento até duas vezes no número de células senescentes. A combinação de vemurafenibe 2 μ M e cloroquina 12,5 μ M produziu uma diminuição no número de células em senescência. Com doses superiores, o número contínuo acima de 15 células / 0,5 mm². A figura 18 apresenta imagens representativas de células consideradas positivas. Estas células são identificadas pela intensa coloração em azul ao redor do núcleo e no citoplasma entre as populações de células viáveis e colônias em crescimento. Observar um grande número de células positivas no grupo tratado com vemurafenibe 2 μ M e cloroquina 12,5 μ M.

Figura 17 - Atividade da β -Galactosidase em células de G-361 tratadas com vemurafenibe (Vemu) e cloroquina (Cloro) nas concentrações indicadas. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Controle

Vemurafenibe 2 μ M

Cloroquina 12,5 μ M

Vemu 2 μ M / Cloro 12,5 μ M

Vemu 2 μ M / Cloro 50 μ M

Figura 18 - Fotomicrografias representativas de células de melanoma G-361 com atividade de β -Galactosidase positiva após o tratamento por 6 horas com vemurafenibe (Vemu) e cloroquina (Cloro) ou a combinação de ambos nas doses indicadas.

4.2 Atividade antitumoral da vemurafenibe e cloroquina *in vivo*.

4.2.1 Grupo Experimental 1

No primeiro grupo experimental *in vivo*, foram avaliados o crescimento tumoral em camundongos BALB/c Nude que receberam de $1-2 \times 10^6$ células das sublinhagens G-361-pLKO expressando DCD e G-361-IBC I com silenciamento de DCD. Os tumores cresceram de forma heterógena nos animais, sendo mais rapidamente em alguns deles e mais tardiamente em

outros. Observou-se uma cinética de crescimento tumoral mais lenta nos camundongos que receberam células de melanoma G-361-IBC I com reduzida expressão de DCD.

Figura 19 - Grupo Experimental 1. Vista panorâmica de camundongos BALB/c dos grupos *pLKO* e *IBC I* apresentando tumores de células G-361 com tamanhos distintos antes (controle) e após os tratamentos com vemurafenibe (v). As fotos e micrografias mostram aspectos macroscópicos e microscópicos dos tumores extraídos dos camundongos dos grupos controle

e tratados do grupo *pLKO (v)* e *IBC I (v)*. A dose de vemurafenibe 50 mg / kg / 24 h / 21 dias foi utilizada nos experimentos. Notar tamanho reduzido dos tumores após o tratamento.

A Figura 19 mostra as imagens macroscópicas e microscópicas dos tumores extraídos dos animais. Os tumores do grupo controle foram maiores e com grandes massas de células necróticas escuras e avermelhadas mostrando o extravasamento de sangue. Ao redor destes tumores cresceram novas massas tumorais de menor tamanho, os quais apresentaram cor clara e consistência sólida. Os tumores extraído dos camundongos tratadas do grupo *pLKO (v)* (N=3) e *IBC I (v)* (N=3) foram menores em comparação aos grupos controles e apresentaram uma cápsula de fibras e tecido tumoral bem mais consistente (Figura 19). No exame dos cortes histológicos de tumores corados com HE pode se ver claramente células em necrose e acúmulo de resto de tecido tumoral amorfo e em degeneração.

4.2.2 Grupo Experimental 2

Neste grupo experimental foram avaliados os crescimentos de tumores de em camundongos BALB/c injetados com células de melanoma G-361-pLKO após os tratamentos com as doses apenas de vemurafenibe 50 mg / kg / 24 h / 21 dias, ou a combinação com vemurafenibe e a cloroquina na dose e intervalo 30 mg / kg / 24 h / 21 dias, ou na dose e intervalo 30 mg / kg / 72 h / 21 dias. Notaram-se tumores tamanhos distintos antes (controle) e após os tratamentos. Porém, o resultado que chamou mais atenção foi o crescimento mais acentuado e vigoroso após a administração de cloroquina no intervalo de 24 horas após a administração de vemurafenibe. Quando a cloroquina foi administrada em um intervalo de 72 horas ocorreu o contrário, o tumor reduziu de tamanho rapidamente, indicando que houve um efeito aditivo quando as duas drogas foram combinadas neste protocolo (Figura 20).

Figura 20 - Grupo experimental 2. Vista panorâmica de camundongos BALB/c dos grupos injetados com células de melanoma G-361-*pLKO* apresentando tumores tamanhos distintos antes (controle) e após os tratamentos com as doses apenas de vemurafenibe 50 mg / kg / 24 h / 21 dias, ou a combinação com vemurafenibe e a cloroquina na dose e intervalo 30 mg / kg / 24 h / 21 dias, ou na dose e intervalo 30 mg / kg / 72 h / 21 dias. Notar que a associação com cloroquina tanto reduziu ou aumentou a massa tumoral dependendo do protocolo de administração.

4.2.3 Grupo Experimental 3

Os experimentos apresentados na figura 19 foram feitos para comparar a cinética de crescimento tumoral entre camundongos BALB/c Nude (A) e camundongos NOD/scid/IL2rg null (B). As células de melanoma G-361-*pLKO* apresentou um crescimento tumoral foi bem mais rápido nos camundongos imunodeficientes NOD/scid/IL2rg null. Estes animais também apresentaram menor tempo de vida (C) quando comparados aos grupos com tumores de células G-361-IBC-I que expressam quantidades reduzidas da proteína DCD (Figura 21).

C

NOD/scid/IL2rg null

Figura 21 - Grupo experimental 3. Vista panorâmica de camundongos BALB/c Nude (A) e camundongos NOD/scid/IL2rg null (B) apresentando tumores de células de melanoma G-361-pLKO e G-361-IBC-I após os períodos de tempo indicados. Notar que o crescimento tumoral foi bem mais rápido nos camundongos imunodeficientes NOD/scid/IL2rg null que receberam as células de melanoma que expressam DCD. Estes animais também apresentaram menor tempo de vida (C) quando comparados aos grupos com tumores de células G-361-IBC-I que expressam quantidades reduzidas da proteína DCD.

4.2.4 Monitoramento de variação de peso corporal

A variação de peso entre os animais foi analisada desde o primeiro dia do experimento quando o tumor apresentava um volume de aproximadamente 100 mm³ e durante os 21 dias de tratamento com as drogas. Os resultados dos grupos controle e grupos tratados foram comparados com grupo *Negativo-sentinela*, este último apresentou uma variação de peso positiva, indicando ganho de peso em comparação aos outros grupos, que perderam massa corporal de maneira continuada e significativo ao longo do crescimento tumoral (Figura 22 A). Estes dados indicam uma tendência para a perda de peso mais acentuada nos animais portadores de tumores de células G-361-pLKO.

4.2.5 Monitoramento da variação do crescimento tumoral

Figura 22 B mostra a variação no volume dos tumores dos grupos G-361-pLKO e G-361-IBC-I sem tratamento e durante o tratamento com vemurafenibe 50 mg / kg / 24 h / 21 dias. O volume tumoral diminuiu de maneira significativa nos grupos com o tratamento em relação aos não tratados. Na Figura 22 C mostra-se uma alteração significativa na variação de volume tumoral entre o grupo pLKO, expressando DCD, o qual apresentou maior sensibilidade ao tratamento inibitório de BRAF^{V600E} em comparação ao grupo com expressão de DCD silenciada.

Figura 22 - Variação de peso corporal do grupo sadio *Negativo – sentinela* em comparação aos grupos controle e tratados com vemurafenibe 50 mg / kg / 24 h / 21 dias (A). Cinética de crescimento nos camundongos do grupo pLKO – Controle em comparação os camundongos dos grupos IBC I – Controle, sem e com o tratamento acima indicado (B). Variação do volume tumoral nos grupos pLKO (v) e IBC I (v) tratados (C). *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

4.2.6 Análise dos efeitos farmacológicos da vemurafenibe sobre órgãos e células dos sistemas imunológico e hematológico

Os gráficos da Figura tabelas 23 mostra os resultados comparativos de variações nos pesos do coração, rins, fígado, baço e músculo gastrocnemius entre o grupo *Negativo – sentinela* e os grupos de camundongos portadores dos tumores G-361-pLKO e G-361-IBC-1 sem ou com tratamento com vemurafenibe. Notou-se em todos os animais uma redução significativa no peso do baço, enquanto os outros órgãos apresentaram pesos iguais aos do grupo controle. Os valores de pesos dos tumores extraídos foram diferencialmente significantes entre os grupos controles sem tratamento e tratados.

Figura 23 - Gráficos de variações de pesos de tumores e dos órgãos indicados extraídos de camundongos BALB/c Nude com tumores de células do melanoma G-361-pLKO e G-361-IBC I sem ou com tratamento com vemurafenibe (v) na dose de 50 mg / kg / 24 h / 21 dias e de camundongos controle - sentinela. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0.001.

A análise histológica do músculo gastrocnemius nos diferentes grupos revelou a presença de fibras musculares normais, sem infiltração de células inflamatórias nem sinais de degeneração sarcoplasmática. Excepcionalmente, verificou-se um maior diâmetro nos miócitos do grupo pLKO tratado com vemurafenibe (Fig. 24).

Figura 24 - Fotomicrografias representativas de cortes transversais (superior) e longitudinais (inferior) (A) e diâmetros médios (B) dos miócitos de músculos gastrocnemius isolados de camundongos portadores de tumores de células de melanoma G-361-pLKO (esquerda) e G-361 IBC-I (direita) sem e com tratamento com vemurafenibe. Coloração HE.

Os resultados dos estudos para avaliar os efeitos do tratamento em células do sistema imunológico e hematológico são representados na Figura 25. Os gráficos mostram as variações no número de glóbulos brancos (WBC) e eritrócitos (RBC) por cada microlitro (μL) de sangue, porcentagem de linfócitos (LYM), células de tamanhos médios (MID) e neutrófilos (NEUT). Os dados foram analisados comparando o grupo *Negativo – sentinela* com os diferentes grupos sem ou com o tratamento.

Notou-se um aumento na porcentagem de linfócitos no sangue dos camundongos com tumores da sublinhagem G-361-pLKO que expressa DCD, tanto no subgrupo tratado e quanto no grupo não tratado. No grupo G-361-IBC-I com expressão de RNAi controla DCD só o subgrupo controle apresentou incremento na porcentagem de linfócitos. Adicionalmente, as porcentagens de neutrófilos não apresentaram diferenças significativas quando comparadas entre os grupos. A porcentagem de linfócitos com tamanho MID, só o grupo *IBC I (v)* apresentou uma porcentagem mais elevada em relação aos outros grupos (Figura 25).

Já o resultado de quantificação de glóbulos brancos mostrou aumento muito significativo nos animais do grupo G-361-IBC I após o tratamento, em relação ao número encontrado no sangue de camundongos do grupo G-361-pLKO com tratamento. Os glóbulos vermelhos (hemácias) apresentaram uma redução muito significativa no sangue dos animais do grupo G-361-pLKO com tratamento. Em resumo, os resultados indicam uma maior tendência de indução de anemia nos camundongos que receberam as células de melanoma G-361-pLKO.

Figura 25 - Variações nas percentagens de células linfocitárias e hematopoiéticas no sangue periférico coletados de camundongos sentinela –negativo, e camundongos portadores de tumores de células de melanoma G-361-pLKO e G-361 IBC-I sem e com tratamento com vemurafenibe (v) na dose de 50 mg / kg / 24 h / 21 dias. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0.001.

4.3 Achados histopatológicos dos tumores de células de melanoma G-361

A figura 26 apresenta várias micrografias ilustrativas de algumas alterações morfológicas e histológicas identificadas nos cortes histológicos de tumores de células de melanoma G-361 obtidos dos camundongos dos grupos pLKO e IBC-I sem e com o tratamento com vemurafenibe. As massas tumorais apresentavam tipos celulares variados e diferentes compactações da cromatina nuclear com dois ou mais nucléolos. Os núcleos picnóticos, fusiformes ou arredondados predominaram nos tumores grandes devido a morte celular por hipóxia (Figura 26 C e I). O estroma tumoral era muito difuso e arquitetura disforme e com aspecto reticulado (Figura 26 B, E, H e K).

Em geral o tecido tumoral de células de melanoma G-361 exibia grandes vasos sanguíneos de pequenos e grandes calibres que se difundiam na superfície dérmica e no interior do tumor. Em particular, os tumores de células G-361 ICB I apresentavam grandes lacunas e dilatações de vasos conforme visto na Figura 26 H. Nos cortes histológicos E e K é notório uma redução no calibre dos vasos de grande diâmetro dos tumores que receberam o tratamento com vemurafenibe 50 mg / kg / 24 h / 21 dias.

Para avaliar e comparar as taxas de divisão celular entre tipos celulares presentes nos tumores de células G-361-pLKO e G-361-IBC I antes e após o tratamento foram feitas contagens de figuras mitóticas nos cortes histológicos. Os resultados índices mitóticos nas populações celulares são apresentados na Figura 27. Foi notória um grande número de células em mitose nos tumores de células G-361-pLKO, o qual foi três vezes superior ao encontrado no grupo de tumores de células de melanoma G-361-IBC I. No exame de mitoses presentes nos tumores após o tratamento com vemurafenibe foi observado uma redução significativa de mitoses nos dois grupos de tumores, indicando a eficácia do tratamento.

Figura 26 - Microfotografias de cortes histológicos de tumores de células de melanoma G-361-pLKO e G-361-IBC I extraídos dos camundongos BALB/c Nude sem ou com tratamento com vemurafenibe (v) na dose de 50 mg / kg / 24 h / 21 dias. Coloração HE.

Figura 27 - Índice mitótico em cortes histológicos de tumores de melanoma G-361-pLKO e G-361-IBC I extraídos de camundongos BALB/c Nude tratados ou não com vemurafenibe (v) na dose de 50 mg / kg / 24 h / 21 dias. **P<0,01, ***P<0.001.

4.4 Análises imuno-histoquímicas

Foram realizados ensaios de imuno-histoquímica em todos os tumores obtidos de todos os camundongos para avaliar a presença de biomarcadores de diferenciação melanocítica e proliferação celular. Os anticorpos e diluições utilizadas estão descritos na Tabela 2. Em todos os ensaios realizados não se identificou reação positiva para pancitoqueratinas (AE1/AE3), dermicidina (DCD), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), marcador de diferenciação melanocítica HMB45, Melan-A e S100. Os ensaios foram repetidos mudando os protocolos de exposição antigênica para cada anticorpo respectivo, utilizando soluções de ácido cítrico-HCl pH 6 e TRIS-EDTA pH 9, e também aquecimento em banho-maria e em forno micro-ondas.

Figura 28 - Microfotografias de cortes histológicos mostrando padrões positivos de expressão dos biomarcadores indicados (à esquerda) na pele humana (A), melanoma humano (B), carcinoma bucal (C) nevos humano (D, E, e F). A direita de cada microfotografia é acompanhada a microfotografia de um corte de tumor de células de melanoma G-361-pLKO extraídos dos camundongos BALB/c Nude. Notar a ausência de reação positiva nos cortes de tumores de células G-361. Os ensaios de imuno-histoquímica foram realizados utilizando os anticorpos e as diluições citadas na tabela 2 de Material e Métodos.

5 DISCUSSÃO

O melanoma cutâneo é a neoplasia de pele de maior mortalidade e grande imprevisibilidade na sua evolução. Na doença disseminada, as opções terapêuticas são poucas e quase sempre ineficazes. Somente recentemente, com desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras seletivas da enzima cinase BRAF com mutação no aminoácido V600E, como o Vemurafenibe e Dabrafenibe, foram possíveis alcançar bons resultados no tratamento de pacientes com melanoma em estágio avançado (Sullivan, Faherty, 2013). Porém, vários mecanismos de resistência intrínseca e extrínseca foram descobertos nos pacientes que apresentaram recorrência da doença imediata ou logo após alguns meses do tratamento. Assim, foi um dos nossos objetivos identificar novos biomarcadores e mecanismos de resistência a quimioterapia dos melanomas.

Na primeira parte deste trabalho apresentamos resultados de estudos *in vitro* para avaliar os efeitos citotóxicos do vemurafenibe sobre células de melanoma humano da linhagem G-361. Como mostrado na análise da viabilidade celular pelo MTT (Figura 13 e 14), se obteve uma IC₅₀ de 2 µM após 20 horas de exposição ao vemurafenibe. A sensibilidade obtida neste ensaio está de acordo com os dados reportados na literatura para várias outras linhagens de melanoma com a mutação BRAF^{V600E}, como exemplos as linhagens, SK-MEL-28, AUCC 257, SK-MEL-5, SK-MEL-2 e A375 (Schöckel et al., 2015). Foi interessante notar que algumas linhagens citadas acima além da expressão da BRAF^{V600E} também apresentam níveis de expressão da proteína DCD altos e moderados. Os valores de IC₅₀ para a linhagem SK-MEL-28 que não expressa DCD foi de 0,5 µM enquanto que linhagem A-375 que expressa DCD, foi de IC₅₀ 8,4µM. A linhagem SK-MEL-5 que também expressa DCD, apresentou uma IC₅₀ de 6µM (Schöckel et al., 2015). A DCD é parte de uma assinatura gênica com 9 genes identificados como potenciais genes preditores dos estágios iniciais e avançados da doença (Burnner et al., 2013). Nossos estudos anteriores mostraram que o silenciamento da DCD por RNA de interferência aumenta a sensibilidade de células de melanoma G-361 e células de carcinoma de mama MDA-MB-361 aos agentes citotóxicos H₂O₂ e TNF-α (Perez-Sosa, 2014; Bancovik et al., 2015; Sangiuliano, 2015). Alguns estudos

de expressão de biomarcadores de melanoma por espectrometria de massa (MALDI-IMS) revelou que a DCD tem expressão significativamente aumentada (3-vezes) em melanomas com invasão em linfonodos regionais (Hardesty et al., 2011). Porém a co-expressão de DCD e BRAF^{V600E} foi identificada em apenas 12 pacientes entre mais de 600 pacientes com melanomas primários e metastáticos segundo estudos clínicos reportados no cBioPortal Cancer Genomics (Sangiuliano, 2015).

Um dos mecanismos de resistência aos quimioterápicos que foi recentemente identificada é a indução de autofagia (Mah, Ryan, 2012). Sabe-se que o vemurafenibe se liga a proteína de ligação à imunoglobulina denominada BiP ou Grp78 provocando a sua dissociação do receptor PERK (Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase). Esta dissociação causa uma resposta celular chamada de estresse no retículo endoplasmático dependente do PERK, que ao final desencadeia o processo autofágico em células tumorais (Amaravadi et al., 2011). Para explorar este possível mecanismo de resistência em nosso modelo experimental utilizamos a cloroquina. Na Figura 14 são apresentados os resultados in vitro em avaliamos a sensibilidade das células de melanoma G-361 a várias doses de cloroquina, e da combinação com vemurafenibe. O IC₅₀ da cloroquina foi igual 100 µM e a combinação promoveu uma redução da viabilidade celular de aproximadamente 50%. Nas figuras 15 e 16 mostramos que a morte celular predominante é a apoptose. Investigações recentes comprovaram que vários inibidores de autofagia podem potencializar a inibição do crescimento de células tumorais com a mutação BRAF^{V600E} ao serem tratadas com vemurafenibe (Lakhter et al, 2013; Goodal et al., 2014; Levy et al., 2014; Ma et al., 2014). A cloroquina e seus derivados são potenciais inibidores de autofagia via interferência no pH dos lisossomos (Pascolo, 2016). Porém, já foram descritos vários outros mecanismos de ação da cloroquina, incluindo indução de morte celular por apoptose, interação com nucleotídeos e reparo de DNA, normalização de vasos sanguíneos e eliminação de células-tronco tumorais (Goodall et al., 2014; Pascolo, 2016). Alguns destes efeitos farmacológicos da cloroquina só ocorrem em altas doses (> 10 mg/ml, 10 mg/kg/24 horas). Por outro lado, foi relatado também que a cloroquina pode promover a proliferação de células tumorais (Pascolo, 2016). Hoje estão em

andamento 19 ensaios clínicos de fase 2 e fase 3 para comprovar a eficácia terapêutica da cloroquina associada a outros agentes quimioterápicos no tratamento de pacientes com tumores sólidos, incluindo gliomas, glioblastomas, carcinomas de mama e melanomas metastáticos (ClinicalTrials, 2017). Existe uma grande expectativa, ainda a se confirmar, para aprovação do seu uso clínico como adjuvante da terapia anticâncer.

O desenvolvimento do estado de senescência celular tem sido apontado como um mecanismo de resistência induzido por quimioterápicos e certos oncogenes ativados por células tumorais sob as condições de estresse metabólico (He, Sharpless, 2017). O vemurafenibe também é capaz diretamente de induzir os padrões morfológicos e bioquímicos da senescência segundo alguns estudos (Amaravadi et al., 2011; Haferkamp et al., 2013; Schöckel et al., 2015). A senescência parece ser uma explicação provável para ausência de efeitos pró-apoptóticos e completa remissão de pacientes tratados com vemurafenibe (Haferkamp et al., 2013). Os resultados apresentados nas Figuras 16 e 17 apontaram um efeito inibitório de indução de células senescentes apenas quando combinação de vemurafenibe foi feita com baixas doses de cloroquina. Recentemente identificou que o encorafenibe (LGX818), um potente inibidor da BRAF^{V600E}, induz senescência acompanhada por autofagia em várias linhagens de melanoma, incluindo as linhagens G-361 (utilizada neste estudo), A-371, SK-MEL 24, RPMI 7951 e C8161 (Li et al., 2016). Notavelmente, os autores mostraram que o efeito era dependente da redução da expressão de ciclina D1, aumento do inibidor de CDKs p27, proteína retinoblastoma e atividade da β -galactosidade (Li et al., 2016). Outro estudo mostrou que o palbociclibe, um inibidor de CDK 4/6, é capaz de induzir senescência em células de melanoma resistentes ao vemurafenibe (Yoshida et al., 2016). Neste estudo foi demonstrado que palbociclibe inibi os efeitos citotóxicos do vemurafenibe (Yoshida et al., 2016). Estudos nesta direção tem sugerido que a indução de senescência poderia ser uma forma de tratamento dos tumores. Esta opção terapêutica é ainda bastante contestada no meio científico.

Na segunda parte deste trabalho apresentamos os resultados in vivo que visam um melhor entendimento do papel da proteína DCD no crescimento de tumores de células de melanoma G-361 em camundongos imunodeficientes

(Figuras 19, 20 e 21). O objetivo destes estudos foi explorar se a expressão da proteína DCD poderia ser um fator de resistência aos efeitos citotóxicos da vemurafenibe. Nestes ensaios foram utilizadas as sublinhagens derivadas das células de melanoma humano G-361, denominada de G-361-pLKO, que expressa o gene da proteína DCD, e a segunda, denominada G-361-IBC I, que expressa shRNA que atua como RNA de interferência inibindo a síntese da proteína DCD. Como mostra a Figura 19, as curvas de crescimento e incremento do volume tumoral foram mais rápidas no grupo de camundongos G-361-pLKO que expressa DCD em relação ao grupo G-361-IBC I. De acordo com estes resultados, mostramos que o índice de mitose (Figura 27) foi superior nos tumores oriundos de camundongos que receberam as células de melanoma G-361-pLKO. A introdução de cloroquina no protocolo experimental revelou que doses administradas a cada 24 horas promoveram o crescimento rápido dos tumores. Quando administradas cada 72 horas houve uma clara regressão da massa tumoral. Este protocolo não foi repetido em número suficiente para sua confirmação estatística. Porém, os dados *in vitro* apresentados nas figuras 13 e 14 mostraram de fato que a cloroquina pode modular os efeitos do vemurafenibe, e ser tanto um agente inibidor como estimulador de crescimento de células tumorais. Assim, futuros estudos são necessários para estabelecer critérios e protocolos para o uso clínico da cloroquina como um agente quimioterápico adjuvante (Pascolo, 2016).

Os animais tratados com vemurafenibe (50 mg / kg / 24h / 21 dias) experimentaram remissão dos tumores (Figura 19, 20, 21 e 22). A inibição da proliferação tumoral mediada por este inibidor de BRAF^{V600E} foi maior no grupo com expressão de DCD (pLKO (v)) mostrando atividade dependente em relação a esta proteína. Outro fato importante para ser mencionado é que, em nenhum dos animais estudados pode se observar uma remissão total dos tumores. Isto indica, como esperado, que houve uma seleção de clones resistentes ao medicamento. Foram feitos vários ensaios para estabelecer culturas de células de clones de células resistentes. Alguns clones de linhagens celulares de melanoma G-361 tratadas com vemurafenibe e cloroquina que cresceram em cultura foram congeladas e serão objetos de estudos no futuro.

Os estudos comparativos de padrões morfológicos e histológicos entre as amostras de tumores mostraram que os tratamentos induziram a morte de células sensíveis e possivelmente também induziram clones células resistentes e/ou senescentes. Os tumores derivados das sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC I apresentaram padrões morfológicos e celulares alterados e padrões histológicos e nucleares atípicos como também vasos sanguíneos malformados. As massas tumorais apresentaram regiões de necrose tumoral e vasos sanguíneos de tamanhos reduzidos. Estudos mais detalhados sobre estados de diferenciação e alterações citoplasmáticas e nucleares de células dos tumores derivados das sublinhagens G-361-pLKO e G-361-IBC I após os tratamentos foram prejudicados devido a pouca ou ausência de expressão de proteínas biomarcadores como HMB45, Melan-A e S100. Por fim, acreditamos que estratégias farmacológicas e protocolos experimentais apresentados neste trabalho poderá fornecer informações importantes em relação aos processos celulares e genômicos associados à resistência ao tratamento com vemurafenibe.

Em resumo este trabalho confirma o potencial e eficácia do vemurafenibe como inibidor da proteína BRAF^{V600E} mutante e sugere que a cloroquina pode ser um potencial adjuvante no tratamento de pacientes com melanomas. Além disso, esta pesquisa confirma o papel da dermcidina como um oncogene e fator de crescimento de células de melanomas malignos.

6 CONCLUSÕES

- As células de melanoma G-361 com BRAF^{V600E} mutante, tanto aquelas que expressaram dermícidina como as que foram DCD silenciadas, são sensíveis a vemurafenibe nas doses administradas nos modelos *in vitro* e *in vivo*.
- A associação de vemurafenibe e cloroquina promoveu um aumento significativo das taxas de apoptose, enquanto diminuiu as taxas de células senescentes em ensaios *in vitro*;
- A atividade do vemurafenibe na inibição do crescimento de tumores de células de melanoma G-361 em camundongos imunodeficientes foi potencializada pela expressão de DCD;
- Cloroquina isoladamente, ou em combinação com vemurafenibe, em doses altas acelerou, enquanto que em doses baixas reduziu o crescimento de células de melanoma G-361 nos ensaios *in vitro*;
- Estudos comparativos de padrões morfológicos e histológicos entre as amostras de tumores sugerem que os tratamentos acima induziram a morte de células sensíveis e o crescimento de populações células resistentes e/ou aumentaram o número de células senescentes;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- Abe R, Shimizu T, Sugawara H, Watanabe H, Nakamura H, Choei H, et al. Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2), 461-7.
- Abel EV, Basile KJ, Kugel CH 3rd, Witkiewicz AK, Le K, Amaravadi RK, et al. Melanoma adapts to RAF/MEK inhibitors through FOXD3-mediated upregulation of ERBB3. *J Clin Invest*. 2013;123(5):2155-68.
- Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, DiPaola RS, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):654-66.
- Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, Matsubara H, Takabe K. Cancer cachexia, mechanism and treatment. *World J Gastrointest Oncol*. 2015;7(4):17-29.
- Bancovik J, Moreira DF, Carrasco D, Yao J, Porter D, Moura R, et al. Dermcidin exerts its oncogenic effects in breast cancer via modulating ERBB signaling. *BMC Cancer*. 2015;15:70.
- Banerjee SS, Harris M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology*. 2000;36(5):387-402.
- Beck SA, Tisdle MJ. Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. *Cancer Res*. 1987;47(22):5919-23.
- Belizário JE, Katz M, Chencker E, Raw I. Bioactivity of skeletal muscle proteolysis-inducing factor in the plasma proteins from patients with weight loss. *Br J Cancer*. 1991;63(5):705-10.
- Belizário JE, Alves J, Occhiucci JM, Garay-Malpartida M, Sesso A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores. *Braz J Med Biol Res*. 2007;40(8):1011-24.
- Belizário JE, Sangiuliano BA, Perez-Sosa M, Neyra JM, Moreira DF. Using pharmacogenomic databases for discovering patient-target genes and small molecule candidates to cancer therapy. *Front Pharmacol*. 2016;7:312.
- Belizário JE, Fontes-Oliveira CC, Borges JP, Kashiabara JA, Vannier E. Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6. *Springerplus*. 2016;5:619.
- Borges JP. Avaliação das alterações morfológicas e bioquímicas no músculo esquelético durante a caquexia induzida pelo tumor B16-PIF. [dissertação (Mestrado

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Brunner G, Reitz M, Heinecke A, Lippold A, Berking C, Suter L, Atzpodien J. A nine-gene signature pre-dicting clinical outcome in cutaneous melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(2):249-258.

Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*. 2010;277(1): 2-21.

Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*. 2017;541(7637):321-30.

Cipakova I, Casperik J, Hostinova E. Expression and purification of human antimicrobial peptide, dermcidin, in *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif*. 2006;45(2):269-74.

ClinicalTrials.gov. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>

Compton CC, Byrd DR, Garcia-Aguilar J, Kurtzman SH, Olawaye A, Washington MK. AJCC cancer staging atlas, a companion to the seventh edition of the AJC cancer staging Manual and Handbook Second edition: Melanoma of the skin. 2nd ed. New York; 2012.385p.

Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov*. 2012;2(3):227-35.

Cunningham TJ, Hodge L, Speicher D, Reim D, Tyler-Polsz C, Levitt P, et al. Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin. *J Neurosci*. 1998;18:7047-60.

Cunningham TJ, Jing H, Akerblom I, Morgan R, Fisher TS, Neveu M. Identification of the human cDNA for new survival evasion peptide (DSEP): studies in vitro and in vivo of overexpression by neural cells. *Experimental Neurology*. 2002;177(1):32-9.

Das-Thakur M, Salanqsang F, Landman AS, Sellers WR, Pryer NK, Levesque MP, et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature*. 2013;494(7436):251-5.

Das-Thakur MD, Stuart D. The evolution of melanoma resistance reveals therapeutic opportunities. *Cancer Res*. 2013;73(20): 6106-10.

Davies M.A., and Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 2010;29(41):5545–55

Deans DA, Wigmore SJ, Gilmour H, Tisdale MJ, Fearon KC, Ross JA. Expression of the proteolysis-inducing factor core peptide mRNA is upregulated in both tumor and

adjacent normal tissue in gastro-esophageal malignancy. *Br J Cancer*. 2006;94:731-6.

Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008;112(13):4793-807

Ebata T, Hirata H, Kawauchi K. Function of the suppressors p53 and Rb in actin cytoskeleton remodeling. *Biomed Res Int*. 2016;;9231057.

Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4): 495-516.

EMA/CHMP/C/002409/2011. Assessment report. Zelboraf. Vemurafenib

Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*. 1977;197: 893-895.

Fontes-de-Oliveira, Cibely C. Efeitos biológicos do PIF/DCD (proteolysis-inducing factor/dermcidin) durante o crescimento e diferenciação celular. [dissertação (Mestrado em farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2005.

Freedman JA, Tyler DS, Nevins JR, Augustine CK. Use of gene expression and pathway signatures to characterize the complexity of human melanoma. *Am J Pathol*. 2011;178(6): 2513-21.

Garay M, Markovic J, Kashiabara JA, Alves J, Lila S, Moura R, et al. Expression of Proteolysis-inducing factor (PIF) by human breast carcinoma, melanoma, monocyte, T and B lymphocytes. *Cancer Res*. 2003;44: 662.

Garay HM. Clonagem, expressão e estudo funcional do Proteolysis-Inducing Factor (PIF).[tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2005.

Goodall ML, Wang T, Martin KR, Kortus MG, Kauffman AL, Trent JM, et al. Development of potent autophagy inhibitors that sensitize oncogenic BRAF V600E mutant melanoma tumor cells to vemurafenibe. *Autophagy*. 2014;10(6):1120-36.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144: 646-674.

Hatzivassilou G, Haling JR, Chen H, Song K, Price S, Heald R, Hewitt JF, et al. Mechanism of KEK inhibition determines efficacy in mutant KRAS – versus BRAF driven cancer. *Nature*. 2013;501(7466):232-6.

Hardesty WM, Kelleyb MC, Mic D, Lowe, Capriola RM. Protein signatures for survival and recurrence in metastatic melanoma. *J Proteomics*. 2011;74:1002-14.

He S, Sharpless NE. Senescence in Health and disease. *Cell*. 2017;169:1000-11.

Hipfel R, Schittel B, Bodingbauer Y, Garbe C. Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. *Br J Cancer* 82(6):1149-57.

INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2016. Rio de Janeiro: INCA: 2016 Acesso: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>

Jensen MM, Jørgensen JT, Binderup T, Kjaer A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Med. Imaging*. 2008;8(1):16.

Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's achilles'heel. *Cancer Cell*. 2008;13(6):472-82.

Lai Y, Villaruz YP, Zuo Y, Huang J, Wang LF. et al. Functional and structural characterization of recombinant dermcidin-IL, a human antimicrobial peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328:553-61.

Lakhter AJ, Sahu RP, Sun Y, Kaufmann WK, Androphy EJ, Travers JB, et al. Chloroquine Promotes Apoptosis in Melanoma Cells by Inhibiting BH3 domain Mediated PUMA Degradation. *J Invest Dermatol*, 2013;133(9):2247-54

Landgraf P, Wahle P, Pape H-C, Gundelfinger ED, Kreutz MR. The survival-promoting peptide Y-P30 enhances binding of pleiotrophin to syndecan-2 and -3 and supports its neuritogenic activity. *J Biol Chem*. 2008;283: 25036-45.

Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2012;505(7484):495-501.

Lee MS, Jeong MH, Lee HW, Han HJ, Ko A, Hewitt SM, et al., PI3K/AKT activation induces PTEN ubiquitination and destabilization accelerating tumourigenesis. *Nat Commun*. 2015;6:7769.

Lee N, Barthel SR, Schatton T. Melanoma stem cells and metastasis: mimicking hematopoietic cell trafficking? *Lab Invest*. 2014;94(1):13-30.

Levy JM, Thompson JC, Griesinger AM Amani V, Donson Am, Birks Dk, et al. Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAF V600E brain tumors. *Cancer Discov*. 2014;4(7):773-80.

Li Z, Jiang K, Zhu X, Lin G, Song F, Zhao Y, et al. Encorafenib (LGX818), a potent BRAF inhibitor, induces senescence accompanied by autophagy in BRAFV600E melanoma cells. *Cancer Letters*. 2016;370:332-44.

Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nature Med*. 2013;19:1401–09.

Lowrie AG, Wigmore SJ, Wright DJ, Waddell, Ross JA. Dermcidin expression in hepatic cells improves survival without N-glycosylation, but requires asparagine residues. *Br J Cancer*. 2006;94(11):1663-71.

Lu H, Liu S, Zhang G, Kwong LN, Zhu Y, Miller JP. Oncogenic BRAF-mediated melanoma cell invasion. *Cell Rep*. 2016;15(9):2012-24.

Ma XH, Piao SF, Dey S, McAfee Q, Karakousis G, Villanueva J, et al. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest*. 2014;124(3): 1406-17.

Mah LY, Ryan KM. Autophagy and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(1):a008821.

Majczak GAH. Caracterização estrutural da proteína recombinante rhPIF/DCD (Proteolysis Inducing-Factor/Dermcidin). [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2005.

Majczak GA, Lilla S, Garay-Malpartida M, Marcovik J, Medrano FJ, de Nucci G, Belizário JE. Prediction and biochemical characterization of intrinsic disorder in the structure of human proteolysis-inducing factor/dermcidin protein. *Genet Mol Res*. 2007;6:1000-11.

Markovic J. Expressão gênica do fator indutor de proteólise (PIF) e de sua forma variante (PIF-SV) em células normais e malignas. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2003.

Maurer M, Somasundaram R, Herlyn M, Wagner SN. Immunotargeting of tumor subpopulations in melanoma patients. *Oncolmunology*. 2012;1(8):1454–6.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Franklin RA, Montalto G, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance. *Oncotarget*. 2012;3(10):1068-111.

McKown RL, Wang N, Raab RW, Karnati R, Zhang, Williams PB, et al. Lacritin and other new proteins of the lacrimal functional unit. *Exp Eye Res*. 2009;88:848-58.

Maciejowski J, Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(3):175-86.

Meng MB, Wang HH, Cui YL, Wu ZQ, Shi YY, Zaorsky NG, et al. Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. *Oncotarget*. 2016;7(35):57391-413.

Meyer S, Fuchs TJ, Bosserhoff AK, Hofstädter F, Pauer A, Roth V, et al. A seven-marker signature and clinical outcome in malignant melanoma: a large-scale tissue-microarray study with two independent patient cohort. *Plos one*. 2012;7(6):e38222.

Mikhaylova M, Schumacher A, Borutzki C, Neumann JR, Macharadze T, El-Mousleh T, et al. Analysis of Y-P30/Dermcidin expression and properties of the Y-P30 peptide. *BMC Research Notes*. 2014;7:400

Minami Y, Uede K, Sagawa K, Kimura A, Tsuji T, Furukawa F. Immunohistochemical staining of cutaneous tumours with G-81, a monoclonal antibody to dermcidin. *Br J Dermatol*. 2004;151:165-169.

Monitto CL, Dong SM, Jen J, Sidransky D. Characterization of a human homologue of proteolysis inducing factor and its role in cancer cachexia. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5862-9.

Moreira DF. Redução do crescimento e resistência celular de carcinoma mamário após silenciamento do gene PIF/DCD (proteolysis-inducing-factor/dermcidin) via expressão shRNA. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

Moreira DF. Avaliação da expressão de genes envolvidos na via de sinalização induzida pela proteína DCD no câncer de mama. [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Moreira DF, Strauss B, Vannier E, Belizário JE. Genes up and down regulated by dermcidin in breast cancer: a microarray analysis. *Genet Mol Res*. 2008;7(4):925-32.

Motoyama JP, Kim-Motoyama H, Kim P, Nakagama H, Miyagawa K, Suzuki K. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357:828-33.

Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol*. 2008;35:433-44.

Parmenter TJ, Kleinschmidt M, Kinross KM., Bond ST, Li J, Kaadige MR, et al. Response of BRAF mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer Discovery*. 2014;4(4):423–33.

Paulitschke V, Berger W, Paulitschke P, Hofstätter E. Vemurafenib resistance signature by proteome analysis offers new strategies and rational therapeutic concepts. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(3):757-68.

Perez-Sosa NM. Análise da expressão de genes regulados pela proteína Dermcidina nas células de melanoma G-361 pelo método de microarray. [dissertação (Mestrado em Oncologia)]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Perez M, Belizário JE. Identification of genes up-and down-regulated by dermcidin in G-361 malignant melanoma cell line. *Cancer Res*. 2013;73(8):3018.

Perez M, Belizário JE. Role of Dermcidin in tumorigenesis of malignant melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2013 Jul;11(7):1-119.

Persike D. Tese de doutorado. Ativação de enzimas caspases e proteassomais em sistemas neurais. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédica, Universidade de São Paulo; 2005.

Porporato PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis*. 2016;5:e200.

Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani, Marks J et al. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Can Res*. 2003;1(5):362-75.

Porter D, Weremowicz S, Chin K, Seth P, Keshaviah A, Lahti-Domenici J, et al. A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 2003;100:10931-6.

Powis G, Kirkpatrick DL. Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7:392-7.

Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell*. 2010;18(5):510-23.

Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and Angiogenesis: Signaling Three-Dimensional Tumor Growth. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000;5(1):24-33.

Rieg S, Garbe C, Sauer B, Kalbacher H, Schitteck B. Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. *Br J Dermatol*. 2004;151: 534-539.

Rieg S, Steffen H, Seeber S, Hummer A, Kalbacher H, Dietz C, et al. Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human in vivo. *J Immunol*. 2005;174: 8003-10.

Rogney C, Cherian S. Effects of chloroquine therapy on white blood cells. *Blood*. 2015;126:1149.

Sagawa K, Kimura A, Saito Y, Inoue H, Yasuda S, Nosaka M, et al. Production and characterization of a monoclonal antibody for sweat-specific protein and its application for sweat identification. *Int J Legal Med*. 2003;117: 90-5.

Sandri S, Faião-Flores F, Tiago M, Pennacchi PC, Massaro RR, Alves-Fernandes DK, et al. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacol Res*. 2016;111:523-33.

Sangiuliano BA. Expressão da dermicidina e correlações clínico-patológicas em melanomas malignos. [dissertação (Mestrado em Oncologia)]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

- Sangiuliano B, Perez M, Caduri A, Aguiar A, Belizário J. Role of dermcidin in tumorigenesis of melanomas. *Cancer Research*. 2012;72:A26.
- Schittek B, Hipfer R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunol*. 2002;2(12):1133-7.
- Schittek B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. *J Innate Immun*. 2012;4(4):349-60.
- Scutti JA, Matsuo AL, Pereira FV, Massaoka M, Figueiredo CR, Moreira DF, et al. Role of SOCS-1 gene on melanoma cell growth and tumor development. *Translational Oncology*. 2011;4(1): 101-109.
- Shannan B, Perego M, Somasundaram R, Herlyn M. Melanoma: heterogeneity in melanoma. *Cancer Treat Res*. 2016;167:1-15.
- Schöckel L, Glasauer A, Basit F, Bitschar K, Truong H, Erdmann G, et al. Targeting mitochondrial complex I using Bay 87-2243 reduces melanoma tumor growth. *Cancer & Metabolism*. 2015;3:11.
- Smoller BR. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Modern Pathology*. 2006;19:s34-40.
- Solit DB, Rosen N. Towards a unified model of RAF inhibitor resistance. *Cancer Discov*. 2014 Jan;4(1):27-30.
- Song C, Weichbrodt C, Salnikov ES, Dynowski M, Forsberg BO, Bechinger B, et al. Crystal structure and functional mechanism of a human antimicrobial membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(12):4586-91.
- Smith KL, Tisdale MJ. Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. *Br. J. Cancer*. 1993;67(4):680-5.
- Steffen H, Rieg S, Wiedemann I, Kalbacher H, Eeg M, Sahl HG, et al. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membrane and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50: 2608-2620.
- Stewart GD, Lowrie AG, Riddick ACP, Fearon KCH, Habib FK, Ross JA. Dermcidin expression confers a survival advantage in prostate cancer cells subjected to oxidative stress or hypoxia. *Prostate*. 2007;67(12):1308-17.
- Stewart GD, Skipworth RJE, Ross JA, Fearon KCH, Baracos VE. The dermcidin gene in cancer: role in cachexia, carcinogenesis and tumor cell survival. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008;11(3):208-13.
- Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJJ, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*. 2014;508(1):118-22.

Sullivan RJ, Flaherty KT. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1297-304.

Talmadge JE, Fidler IJ. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*. 2010;70(14):5649–69.

Timar J, Gyorffy B, Raso E. Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma: too much for too little? *Clin Exp Metastasis*. 2010;27:371-87.

Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev*. 2009;89:381-410.

Todorov P, Carluk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature*. 1996;379(6567):739-42.

Tsujimoto, Y., Shimizu, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2005;12:1528–34.

Todorov P, Deracon M, Tisdale MJ. Structural analysis of a tumor-produced sulfated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation. *J Biol Chem*. 1997;272(19):12279-88.

Thurin M, Marincola FM. Molecular diagnostics for melanoma, methods and protocols. New York: Springer; 2014. 259p.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cell in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(10):755-68.

Wagle N, Emery C, Berger MF, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol*. 2011;29(22):3085-96.

Wang Z, Corey E, Hass GM, Higano SS, True LD, Wallace Jr D, et al. Expression of the human cachexia-associated protein in prostate cancer and in a prostate cancer animal model of cachexia. *Int J Cancer*. 2003;105(1):123-9.

Weinberg RA. The biology of cancer: the nature of cancer. 2nd ed. New York: Garland Science; 2016:31p

Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature*. 2012;487(7408):505-9.

Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*. 2014;509(7502):582-7.

Wu RA, Upton HE, Vogan JM, Collins K. Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annu Revi Biochem*. 2017;86:439-60.

Yoshida A, Lee EK, Diehl A. Induction of therapeutic senescence in vemurefenibe-resistant melanoma by extended inhibition of CD4/6. *Cancer Res.* 2016;76(10):2990-3002.