Abdo Salomão Júnior

**Infusão transdérmica de fármaco
no tratamento do melanoma murino B16F10**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.
Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Salomão Júnior, Abdo

Infusão transdérmica de fármaco no tratamento do melanoma murino B16F10 /
Abdo Salomão Júnior -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular,
Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Durvanei Augusto Maria.

Descritores: 1.Melanoma 2.Infusão transdérmica 3.Radiofrequência 4.Etoposídeo
5.Sistemas de liberação de medicamentos 6.Terapia a laser

USP/FM/DBD-197/17

Abdo Salomão Júnior

**Infusão transdérmica de fármaco
no tratamento do melanoma murino B16F10**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.
Orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

**São Paulo
2017**

Dedico este trabalho....

À minha esposa Adriana,

Companheira, amiga, incentivadora.....

Sua paciência, carinho e desprendimento me permitiram

concluir esta importante etapa de minha vida.

Ao meu filho João Abdo,

Farei valer cada dia ausente de sua vida e

farei o meu melhor para ser um exemplo para você.

Aos meus pais Abdo e Nair,

O caráter, o apoio, a humildade, o exemplo e o amor a mim dispensados

sempre me deram forças para seguir em frente.

Aos meus irmãos que sempre me incentivaram e ajudaram

em todos os momentos da minha vida, em especial ao Emil que,

além de ser um amigo e um companheiro, sempre me deu suporte para estudar.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, por sua capacidade, serenidade, amizade e empenho na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cyro Festa Neto do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP por ter me aceito na pós-graduação e orientado o caminho a seguir.

À Prof. Dra Juliana Pereira do Departamento de Clínica Médica /LIM 31 por ter me auxiliado e apoiado na oficialização de minha pós graduação.

A todos os funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan que direta e indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Ao colega de pós-graduação Arthur Luna por sua ajuda na interpretação dos dados e diagramação dos textos.

Aos meus professores da graduação e da residência médica pelo incentivo constante na busca do conhecimento científico.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado do International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	2
Preparado pela biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	2
AGRADECIMENTOS.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer de pele e Melanoma	4
1.3. Estadiamento do melanoma	11
1.4. Marcadores sorológicos do melanoma	15
1.5. Tratamento do melanoma	18
1.6. Infusão Transdérmica de Fármacos (ITDF)	20
1.6.1. Estrutura da pele.....	20
1.6.2. Permeação cutânea de fármacos	22
1.6.3. Administração transdérmica de fármacos	24
1.6.4. Gerações de sistemas de infusão transdérmica de fármacos	26
1.7. ITDF por ablação térmica utilizando dispositivo de radiofrequência	30
1.7.1. Monopolar.....	31
1.7.2. Unipolar	31
1.7.3. Bipolar	32
1.7.4. Tri ou multipolar	32
1.7.5. Monopolar Multifocal	33
1.7.6. Fracionada	34
1.7.7. Microagulhada	35
1.8. O ciclo celular	36
1.9. Alterações mitocondriais na apoptose.....	38
2. OBJETIVOS.....	40
2.1. Objetivo geral	41
3. MÉTODOS	42
3.1. Animais de experimentação	43
3.2. Cultura da célula tumoral e inoculação nos animais.....	43
3.3. Inoculação das células tumorais de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J	44
3.4. Delineamento experimental	45
.....	46
3.5. Avaliação do crescimento do tumor	46
3.6. Tratamento dos animais portadores de melanoma	46

3.7. Análise do perfil hematológico.....	48
3.8. Necropsia dos animais	49
3.9. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo	49
3.10. Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial.....	50
3.11. Análise do processo autofágico LC-3 por citometria de fluxo.....	51
3.12. Análise histopatológica dos tumores e dos órgãos internos.....	51
4. RESULTADOS.....	53
4.1. Avaliação do peso dos animais.....	54
4.2. Avaliação do volume tumoral	55
4.3. Avaliação do perfil hematológico dos animais tratados	56
4.4. Determinação das fases do ciclo celular.....	59
4.5. Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	61
4.6. Determinação do processo autofágico por citometria de fluxo.....	63
4.7. Alterações histopatológicas dos órgãos dos camundongos do grupo controle e tratamentos.....	65
5.DISSCUSSÃO	73
6.CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ITDF	Infusão Transdérmica de Fármacos;
USP	Universidade de São Paulo;
et al	colaboradores;
W/cm ²	Watts por centímetro quadrado;
μs	micro segundo;
J/cm ²	Joule por centímetro quadrado;
DTIC	Dacarbazina;
FDA	Food and Drugs Administration;
DNA	Ácido Desoxirribonucleico;
ATM	(de ATM quinase);
RF	Radiofrequência;
INCA	Instituto Nacional do Câncer;
UV	Ultravioleta;
UVA	Ultravioleta A;
UVB	Ultravioleta B;
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular;
CAM	Molécula de Adesão Celular;
OHSIE	World Health Organization Classification of Tumors;
CDDP	Cisplatina;
Khz	Quilohertz;
Ghz	Gigahertz;
CEUAIB	Comissão de Ética para Uso de Animais do Instituto Butantan
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
ATCC	American Type Culture Collection;
RPMI	Ralph Roswell Park memorial Institute;
SFB	Soro Fetal Bovino;
UI/ml	Unidade Internacionais por mililitro;
mM	Milimol;
μl	Microlitro;
Co2	Dióxido de Carbono;
cm ²	Centímetros quadrados;
mm	Milímetro;
mm ³	Milímetros Cúbico;
mm ²	Milímetro Quadrado;
PIN	Pino;
mg/l	Miligramas por litro;
PBS	Tampão fosfato salino
mg/kg	Miligramas por Quilo;
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório;
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético;
FACS	Separador de células ativadas por fluorescência;
Rpm	Rotações por minuto;
LCD	Liquid Cristal Display;
DP	Desvio Padrão;
ΔΨm	Potencial Elétrico de Membrana Mitocondrial;
H&E	Hematoxilina e Eosina;
pH	Potencial de Hidrogênio.

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem;
°	Graus;
°C	Graus Celsius;
>	Maior;
<	Menor;
=	Igual;
p	Valor ou nível de significância;
-	Menos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Transição do melanócito para o melanoma metastático. Adaptado de: Miller e Mihm (2006).
- Figura 2** Espectro electromagnético da radiação UV e os efeitos biológicos sobre a pele. Adaptado de: D’Orazio et al., 2013.
- Figura 3** Estrutura da pele. Adaptado de: Sharma et al., 2011.
- Figura 4** Vias de permeação cutânea. Adaptado de: Marwah et al., 2016.
- Figura 5** Técnica de iontoforese. Adaptado de Marwah et al., 2016.
- Figura 6** Técnica de ultrassom. Adaptado de Marwah et al., 2016.
- Figura 7** Sistema de ITDF utilizando microagulhas, com controle digital.
- Figura 8** Espectro eletromagnético e os diferentes lasers, com seus comprimentos de onda.
- Figura 9** Esquema da RF monopolar.
- Figura 10** Esquema da radiofrequência unipolar.
- Figura 11** Esquema da radiofrequência bipolar.
- Figura 12** Esquema da radiofrequência multipolar. (A) Vista lateral; (B) Vista sagital.
- Figura 13** Esquema da radiofrequência Monopolar Multifocal. (A) Vista lateral; (B) Vista sagital.

- Figura 14** RF fracionada. (A) Imagem do eletrodo; (B) Representação esquemática da pele.
- Figura 15** RF microagulhada. Representação esquemática do sistema de RF microagulhada com agulhas isoladas perfazendo pontos de coagulação na derme.
- Figura 16** Ciclo celular e pontos de checagem. Adaptado de Lombardi e Lasagni, 2010.
- Figura 17** Desenho esquemático da inoculação das células tumorais do melanoma B16F10 na região dorsal dos camundongos. Fonte: Salomão et.al., 2016.
- Figura 18** Desenho esquemático mostrando o tratamento dos camundongos com a infusão transdérmica de etoposídeo sobre as massas tumorais. Fonte: Salomão et. al., 2016.
- Figura 19** Determinação do peso médio dos animais portadores de melanoma dorsal do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo ou com RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. .
- Figura 20** Determinação do volume tumoral dos animais portadores de melanoma do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. .
- Figura 21** O gráfico de barras demonstra a análise do número total de leucócitos, dos animais portadores de melanoma do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 22 O gráfico de barras demonstra a análise do número total de leucócitos, dos animais portadores de melanoma do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 23 O gráfico de barras demonstra a análise do número total de plaquetas, dos animais portadores de melanoma do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 24 Análise da distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular das células tumorais de melanoma. (A) Gráficos do tipo Dot plots e (B) histogramas representativos das análises do ciclo celular, adquiridos por citometria de fluxo e analisados pelo programa WindMdi 2.9.

Figura 25 Avaliação dos efeitos no ciclo celular no grupo controle e nos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. A: Fração subdiploide (sub-G₁). B: Distribuição das células nas fases do ciclo celular. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Figura 26 Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial. Histogramas representativos (A) e gráficos (B) demonstram a porcentagem de células com mitocôndrias ativas e inativas. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

Figura 27 A) Os histogramas representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência, demonstrando a porcentagem de células com o potencial elétrico

mitocondrial ativo e inativo. (B) O gráfico de barras demonstra a porcentagem de células tumorais com o potencial elétrico mitocondrial ativo e inativo. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

Figura 28 Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados com etoposídeo, aplicado na concentração de 1 mg/l. (A, B) Parênquima renal; (C, D) parênquima hepático. Coloração de H&E.

Figura 29 Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados com etoposídeo, aplicado na concentração de 1 mg/l. (G) parênquima pulmonar; (H) parênquima do baço. Presença de células atípica (seta); áreas com focos de necrose (asterisco). Coloração de H&E.

Figura 30 Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados apenas com RF, utilizando-se tips fracionados 100 PIN, energia de 39,0 Joules, duração do pulso de 0,4s, nível II. (A, B) Parênquima do baço; (C) parênquima renal; (D, E) parênquima hepático. Coloração de H&E.

Figura 31 Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados apenas com RF, utilizando-se tips fracionados 100 PIN, energia de 39,0 joules, duração do pulso de 0,4s, nível II. (G, H) parênquima pulmonar. Presença de células atípicas (seta); áreas com foco de necrose (asterisco). Coloração de H&E.

Figura 32 Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados com RF associada ao etoposídeo. (A, B) Parênquima hepático; presença de formação de corpos apoptóticos (seta). (C, D) parênquima renal. Coloração de H&E.

Figura 33

Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados com RF associada ao etoposídeo. (E, F) arquitetura da massa tumoral; é possível evidenciar a presença de corpos apoptóticos (seta). (G) parênquima do baço; (H) parênquima pulmonar; é possível observar a presença de células com aspecto atípico. Área com necrose (asterisco). Coloração de H&E.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1

Classificação TNM do melanoma cutâneo classificado em relação à extensão do tumor (T), presença ou ausência de linfonodos regionais (N) e de metástase (M) (Santos, 2005).

RESUMO

Salomão Júnior A. *Infusão transdérmica de fármaco no tratamento do melanoma murino B16F10* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A incidência de casos de melanoma tem aumentado em todo o mundo sendo que, apesar do diagnóstico precoce e do advento das terapias moleculares, o número de pacientes que morrem com a doença em estágio avançado continua em elevação. Deste modo as pesquisas atuais têm focado no desenvolvimento de diferentes estratégias para a disponibilização de terapias eficazes e acessíveis. Nesse contexto, a via de administração transdérmica constitui uma alternativa promissora para aumentar a eficácia local e sistêmica de fármacos, incluindo agentes antitumorais. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para maximizar a permeação cutânea de fármacos, destacando-se, entre esses, a ablação térmica por radiofrequência (RF). Esse processo resulta na criação de vários microcanais entre a epiderme e a derme, pelos quais diversas moléculas podem passar em direção às camadas mais profundas da pele. Nesse estudo, a eficácia da infusão transdérmica de etoposídeo por dispositivo de radiofrequência fracionada foi avaliada em modelo de melanoma murino. Camundongos da linhagem C56BL/6 foram divididos nos seguintes grupos experimentais: 1) controle; 2) tratados com radiofrequência; 3) tratados com a aplicação tópica de etoposídeo; e 4) tratados com radiofrequência e posterior aplicação tópica de etoposídeo. Os tratamentos foram realizados durante o período de 28 dias. O peso corpóreo, o volume tumoral e o perfil hematológico foram avaliados semanalmente. Ao término do tratamento os animais foram eutanasiados e procedeu-se a coleta da massa tumoral e dos órgãos (pulmão, baço, rins, linfonodos e fígado) para análise histopatológica. As células tumorais obtidas das massas tumorais foram analisadas quanto às alterações do ciclo celular e do potencial transmembrânico mitocondrial. Os resultados demonstraram que o tratamento com etoposídeo isolado reduziu a sobrevida dos animais e ocasionou alterações histológicas indicativas de toxicidade. Em contrapartida, a infusão transdérmica do etoposídeo por dispositivo de radiofrequência promoveu redução significativa do volume tumoral, em comparação com todos os grupos experimentais, sem ocasionar mortalidade. Esse tratamento também diminuiu a plaquetocitose e elevou o número de eritrócitos em comparação com os outros grupos. A análise histopatológica dos órgãos dos animais tratados com RF + etoposídeo evidenciou que não houveram alterações significativas na arquitetura tecidual. Ainda, o grupo tratado com RF + etoposídeo foi o que apresentou o maior percentual de células estacionadas na fase S/G₂M e com mitocôndrias inativas, evidenciando o aumento da eficácia demonstrada no estudo *in vivo*. O conjunto de resultados sugere que o tratamento com a radiofrequência seguida do etoposídeo resulta em melhor resposta antitumoral do quimioterápico, com baixos índices de toxicidade sistêmica.

Descritores: melanoma; infusão transdérmica; radiofrequência; etoposídeo; sistemas de liberação de medicamentos; terapia a laser.

SUMMARY

Salomão Júnior A. *Infusão Transdérmica de Fármaco no tratamento do melanoma murino B16F10* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

The incidence of melanoma cases has increased worldwide and, despite early diagnosis and targeted molecular therapy, the number of patients dying from metastatic disease continues to rise. Thus, current research has focused on the development of different treatment strategies to provide efficient and accessible solutions. In this sense, transdermal delivery is a promising alternative enhancing the local and systemic efficacy of drugs, including antitumor agents. Several methods have been developed to improve the skin permeation of drugs, highlighting, among those, the radiofrequency thermal ablation (RFA). This process results in the creation of many microchannels between the epidermis and the dermis through which several molecules can pass towards the deeper layers of the skin. In this study, the efficacy of the transdermal delivery of etoposide by a fractional radiofrequency device was evaluated in a murine melanoma model. C56BL/6 lineage mice were divided into the following experimental groups: 1) control; 2) treated with radiofrequency; 3) treated with topical applications of etoposide; and 4) treated with radiofrequency followed by topical applications of etoposide. The animals were treated for 28 days and the body weight, tumor volume and hematological profile were analyzed weekly. At the end of the treatments, the animals were euthanized and the tumor mass and organs (lung, spleen, kidneys, lymph nodes and liver) were collected for histopathological analysis. Tumor cells obtained from the tumor masses were analyzed for changes in the cell cycle and mitochondrial transmembrane potential. The results showed that the treatment with etoposide alone reduced the survival of the animals and caused histological changes indicating toxicity. On the other hand, the transdermal delivery of etoposide by a radiofrequency device resulted in a significant reduction of the tumor volume, in comparison with all the experimental groups, not causing mortality. This treatment also decreased thrombocytosis and increased the number of red blood cells compared to the other groups. The histopathological analysis of the organs from animals treated with RFA + etoposide demonstrated that there was no significant change in tissue architecture. Furthermore, the group treated with RFA + etoposide presented the highest percentage of cells with inactive mitochondria and interruption at the S/G₂M stage, corroborating the increased efficacy of the *in vivo* study. The set of results indicates that the treatment with radiofrequency followed by etoposide results in better antitumor responses of chemotherapy, with low toxicity rates.

Descriptors: melanoma; transdermal delivery; radiofrequency; etoposide; drug delivery systems; laser therapy.

1. INTRODUÇÃO

A incidência de casos de melanoma tem aumentado em todo o mundo e, apesar do diagnóstico precoce, da ressecção cirúrgica adequada e da disponibilidade das terapias moleculares, o número de pacientes que morrem com a doença em estágio avançado (melanoma metastático) continua em elevação. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 80% de todas as mortes relacionadas ao câncer de pele são atribuídas ao melanoma, embora este compreenda apenas 5% de todos os tumores (Organização Mundial de Saúde, 2015; INCA, 2017).

O melanoma frequentemente desenvolve mecanismos de resistência à radioterapia e quimioterapia. Desta maneira, a detecção do tumor no estágio inicial é imprescindível para a aplicação de métodos curativos, pois a doença metastática possui um prognóstico extremamente desfavorável (Kalal et al., 2017; Millet et al., 2017). Contudo, com o advento das terapias alvo-específicas e da imunoterapia, ocorreu uma elevação significativa da taxa de sobrevida devido às respostas clínicas duradouras em comparação com as terapias padrão (Sait et al., 2015; Luo; Shen, 2017). Entretanto, para a parcela dos pacientes que desenvolve resistência tais respostas clínicas são menos evidentes. Deste modo, as pesquisas atuais têm focado no desenvolvimento de diferentes estratégias terapêuticas, como a combinação de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapias moleculares e imunoterapia (Ascierto et al., 2016; Kalal et al., 2017; Luk et al., 2017).

Nesse contexto, o sistema de infusão transdérmica de fármacos (ITDF) constitui uma alternativa promissora para aumentar a eficácia local e sistêmica de fármacos, incluindo agentes antitumorais (Swain et al., 2001; Williams, 2003; Praunitz et al., 2004; Prausnitz et al., 2008; Guy et al., 2009; Kumar et al., 2013; Chinchole et al., 2016). A via de administração transdérmica apresenta diversas vantagens em comparação com as vias oral e intravenosa, sendo as principais: entrega do fármaco

diretamente no tecido alvo sem o efeito de primeira passagem pelo fígado, resultando no aumento da eficácia e na redução da toxicidade (Bronaugh et al., 2005; Kumar et al., 2013; Marwah et al., 2016; Chinchole et al., 2016). A principal limitação desta técnica é que apenas fármacos de baixo peso molecular (algumas centenas de Dalton) apresentam boa penetração, sendo esta a principal dificuldade para a permeação de moléculas hidrófilas, macromoléculas e peptídeos (Chinchole et al., 2016).

Nesse trabalho, avaliou-se a eficácia antitumoral do sistema de infusão transdérmica realizado por meio de dispositivo de radiofrequência fracionada para a infusão de etoposídeo, frente ao melanoma murino

1.1. Câncer de pele e Melanoma

O câncer de pele é o mais frequente no Brasil e corresponde a 30% de todos os tumores malignos registrados no País. O melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas deste órgão, sendo o mais grave devido à sua alta possibilidade de produzir metástase (INCA, 2017). Segundo o Instituto Nacional de Câncer, as estimativas para 2016, válidas também para 2017, apontam que no Brasil ocorrerão 5.670 novos casos de câncer de pele tipo melanoma (3.000 em homens e 2,670 em mulheres). Esse tipo de câncer atinge principalmente pessoas entre 30 e 60 anos de idade, tendo maior prevalência em adultos caucasianos (INCA, 2017).

O melanoma é um tumor de origem neuroectodérmica, formado a partir dos melanócitos que são encontrados ao longo da camada basal da epiderme, os quais possuem como função principal a produção do pigmento melanina (Anger et al., 2010; Ali et al., 2013). O melanoma origina-se em pele sã e, raramente, de lesões pigmentadas pré-existentes, desenvolvendo-se em qualquer área do tegumento. Excepcionalmente, pode atingir mucosas, leptomeninges e globo ocular (Kutlubay et al., 2013).

A transição do melanócito para o melanoma metastático envolve tipos histológicos intermediários, incluindo atipia melanocítica, hiperplasia melanocítica atípica, melanoma de crescimento radial, melanoma de crescimento vertical e melanoma metastático (Figura 1) (Miller; Mihm, 2006).

A proliferação controlada de melanócitos normais promove o surgimento de nevos melanocíticos benignos. O nevo atípico ou displásico é oriundo do crescimento anormal de melanócitos em um nevo preexistente, resultando em lesão pré-maligna com atipia citológica aleatória (Chudnovsky et al., 2005; Gaggioli; Sahai, 2007). Na fase de crescimento radial, os melanócitos adquirem capacidade de proliferar-se

horizontalmente na epiderme e histologicamente mostram atipia contínua (melanoma *in situ*). Na fase de crescimento vertical, numerosos eventos bioquímicos, incluindo a perda de E-caderina e a expressão de N-caderina, permitem que as células malignas invadam a membrana basal e proliferem verticalmente na derme, como um nódulo em expansão com potencial metastático (Figura 1). Os melanomas metastáticos malignos se espalham para outras áreas do corpo, geralmente primeiro para os linfonodos, depois para a pele, tecidos subcutâneos moles, pulmões, fígado e cérebro (Miller;Mihm, 2006; Uong; Zon, 2010).

Figura 1: Transição do melanócito para o melanoma metastático. Adaptado de: Miller e Mihm (2006).

O melanoma tem ampla capacidade de produzir metástases em diferentes órgãos. Os locais metastáticos iniciais mais comuns são própria a pele, o tecido subcutâneo e os gânglios linfáticos, com ocorrência em 42% a 59% dos pacientes. Nas recidivas, as metástases viscerais ocorrem em aproximadamente 25% dos pacientes, onde os sítios

mais comuns são: pulmão (18-36%), cérebro (12-20%), fígado (14-20%) e ossos (11-17%) (Lee et al., 2000; Manola et al., 2000; Tas , 2012; Rastrelli et al., 2014).

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que fatores ambientais e genéticos de riscos influenciam na iniciação e progressão do melanoma. Os principais são (Chen et al., 2013; Zebary et al., 2013; Luo; Chen, 2017):

- Sexo: homens com idade superior a 60 anos são mais susceptíveis;
- Predisposição fenotípica: pessoas sensíveis ao sol, com cabelos ruivos e olhos azuis, com manchas atípicas ou nevo displásico;
- Exposição a raios UV e queimaduras solares;
- Comorbidades: lesões pré-cancerosas, como carcinoma de células escamosas, e organismos imunossuprimidos;
- Pré-disposição genética: histórico familiar; polimorfismos relacionados ao desenvolvimento do melanoma, como nos genes CDKN2A, CDK4, MCR1; mutações nos genes BRAF, NRAS, KIT, PTEN.

1.2. Etiologia do câncer de pele

Apesar dos dados oriundos de estudos epidemiológicos e experimentais não fornecerem uma relação causal direta entre a radiação ultravioleta (UV) e o desenvolvimento de melanoma, é aceito que os raios UV consistem no principal fator de risco ambiental para o surgimento deste tipo de tumor (Anna et al., 2007). A radiação UV pode afetar a integridade do DNA e a homeostase tecidual, bem como é capaz de promover mutações ou afetar a expressão de uma multiplicidade de genes, incluindo oncogenes e genes supressores de tumores (Polefka et al., 2012). Assim, os raios UV

podem de atuar tanto como agente iniciador quanto como promotor tumoral. (Levy et al., 2006; D'Orazio et al., 2013).

A radiação UV pode ser subdividida em UVA, UVB e UVC, de acordo com suas propriedades eletrofísicas (Figura 2). Os raios UVC possuem os comprimentos de onda mais curtos (100-280 nm) e energias mais altas. Os raios UVA possuem comprimentos de onda mais longos, mas são menos energéticos. Os raios UVB (315-280 nm) possuem comprimentos de ondas e energias intermediários entre os das radiações UVA e UVC (Jhappan et al., 2003; Brenner et al., 2005; Ikehata; Ono, 2011).

A penetração da radiação na pele ocorre de acordo com o comprimento de onda e os efeitos sobre as células e tecidos são diferentes (Figura 2). Como exemplos podem ser citados as respostas inflamatórias das queimaduras solares, as hiperqueratoses secundárias aos danos aos queratinócitos, a pigmentação da pele secundária ao estímulo dos melanócitos e a indução de danos ao DNA destas células pela radiação UV (Cui et al., 2007; Coelho et al., 2009; Skobowiat, et al., 2011; Sklar et al., 2013).

O espectro UVC é altamente mutagênico, mas não atinge a superfície terrestre porque é absorvido pela camada de ozônio estratosférica. Assim, os raios de luz emitidos pelo sol são predominantemente UVA (90% -95%) e UVB (5% -10%) (Agar et al., 2004; Anna et al., 2007). Os raios UVA penetram profundamente na derme, mas apesar de serem pouco absorvidos pelo DNA devido a sua baixa, são absorvidos por outros cromóforos celulares que atuam como fotossensibilizadores (como os precursores da melanina), produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem danificar o DNA por meio de reações de fotossensibilização (Sander et al., 2004; D'Orazio et al., 2013). Os radicais livres também atacam outras macromoléculas, como RNA, lipídeos e proteínas, interferindo com as suas funções. A oxidação das bases de

nucleotídeos promove erros no pareamento, promovendo mutagênese (Burke et al., 2010).

Figura 2: Espectro electromagnético da radiação UV e os efeitos biológicos sobre a pele. Adaptado de: D’Orazio et al., 2013.

A radiação UVB é quase completamente absorvida pelo estrato córneo da epiderme pouco atingindo a derme. No entanto, por ser energeticamente mais eficiente que o UVA, é absorvido por componentes moleculares particularmente o DNA, induzido danos em células e tecidos (Douki et al., 2003; Courdavault et al., 2005). Como consequência da ação direta sobre o DNA ocorre a formação de fotoproductos específicos, tais como ciclobutano de pirimidina (CPD) e o fotoproducto (6-4)-pirimidina-pirimidona [(6-4)PPs], os quais são altamente mutagênicos. Eles

comprometem a transcrição do DNA, bloqueiam a replicação e promovem o pareamento incorreto de bases. Tais fotoprodutos causam padrões de mutação, como por exemplo o TT→CC conhecido como assinatura mutacional da luz UV. A abundância destas assinaturas em genes que regulam a carcinogênese do melanoma corrobora fortemente com a tese de que a radiação UV causa câncer de pele (Anna et al., 2007; Hoeijmakers et al., 2009; Hodis et al., 2012; D’Orazio et al., 2013).

O mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é mediado por pelo menos oito enzimas que trabalham em conjunto para: identificar as lesões no DNA que distorcem a estrutura da dupla hélice, excisar a região danificada e sintetizar a cadeia complementar do DNA. Os polimorfismos dos genes envolvidos no reparo do DNA estão relacionados com o desenvolvimento do melanoma (Leibeling et al., 2006; Nospikel et al., 2009).

Quanto aos fatores genéticos que influenciam na iniciação e progressão do melanoma, uma gama de estudos tem demonstrado que diversos pacientes apresentam mutações genômicas ou amplificações genéticas em alguns genes, principalmente no BRAF, KIT E NRAS. O *status* das mutações ajuda a estimar o prognóstico e a orientar a seleção do regime de tratamento (Zebary et al., 2013; Luo; Chen, 2017).

O BRAF é um gene humano que está localizado no cromossoma 7p34 e é altamente expresso em melanoma, câncer colorretal e células hematopoiéticas. É classificado como proto-oncogene, um gene normal que, em razão da mutação, se torna um oncogene. Aproximadamente 50% dos pacientes com melanoma avançado apresentam mutações BRAF (Jakob et al., 2012; Zebary et al., 2013). Estudos prévios mostraram que as mutações no BRAF estão relacionadas com a exposição aos raios ultravioleta e à luz solar. Estas mutações ocorrem, principalmente, no melanoma

cutâneo. O éxon 15 é o local mais frequente da mutação no gene BRAF, onde as mutações V600E e V600K são as mais comuns (Menzies et al., 2012; Si et al., 2012).

O gene KIT localiza-se no cromossomo 4q11-12 e codifica a proteína KIT (CD117), que é um receptor de tirosina quinase importante para a regulação do ciclo celular em melanócitos normais (Luo; Chen, 2017). O ligante Stem cell factor (SCF) se liga no KIT e ativa a sua função tirosina quinase intrínseca, resultando na ativação de vias de cascatas de sinalização, como MAPK, PI3K/AKT e JAK/STAT, culminando na regulação gênica de vários mecanismos celulares, incluindo crescimento celular, proliferação e diferenciação (Antonescu et al., 2007). No melanoma, as mutações mais comuns no KIT são localizadas nos éxons 11 (aproximadamente 70%), 13 (cerca de 13%) e 17 (aproximadamente 9%). Estudos demonstram que a proliferação anormal nos melanócitos é resultante de interações entre as mutações do KIT e o ambiente (Choi et al., 2013; Lyle and Long, 2013).

Outro importante oncogene no melanoma é o NRAS. A ativação de NRAS mutada pode levar à transdução de sinal anormal nas vias de sinalização da MAPK e PI3K/AKT. A taxa de mutação do NRAS no melanoma é de cerca de 20% e as mutações comuns ocorrem nos éxons 1 (G12C, G12D e G12A) e 2 (Q61K, Q61R, Q61L e Q61H) (Jakob et al., 2012; Kelleher; McArthur, 2012; Fedorenko et al., 2013).

O PTEN, localizado no cromossoma 10q23, é frequentemente afetado pela perda de heterozigotidade. É considerado um gene supressor tumoral e pode inibir a via PI3K. Estudos demonstram que a taxa de mutação de PTEN é de aproximadamente 30-40%, em linhagens celulares de melanoma, e cerca de 10% em células primárias de melanomas. Os locais mais frequentemente de mutações estão localizados no éxon 5 (Aguissa-Toure; Li, 2012; Abbotts et al., 2014).

Os estudos focados em famílias com alta incidência de melanomas comprovam que aproximadamente 5 a 10% dos pacientes afetados possuem um histórico familiar da doença, onde 20 - 60% deles apresentam mutações no gene CDKN2A (Bishop et al., 2002; Goldstein et al., 2007). Mutações no oncogene CCND1 também estão envolvidas nos processos de ulceração e metástases do melanoma. A expressão da proteína CCND1 relaciona-se com a espessura de Breslow, presença de metástase e tempo de sobrevida mais curto (Oba et al., 2011).

Fatores genéticos também influenciam no risco de indução do câncer por raios UV. O receptor de melanocortina 1 (MC1R) é um locus genético crítico envolvido na pigmentação, na resposta adaptativa ao bronzeamento e na susceptibilidade ao melanoma (D'Orazio et al., 2013). Além de mediar a resposta ao bronzeamento, o MC1R exerce uma influência poderosa sobre a capacidade dos melanócitos de reparar os danos causados ao DNA por meio da via NER (Sturm et al., 2002; Abdel-Malek et al., 2009). Estudos demonstram que polimorfismos no MC1R são correlacionados com a elevação da sensibilidade a radiação UV, o reparo menos eficiente dos danos no DNA e o aumento do risco de melanoma (Landi et al., 2002; Wong et al., 2012).

1.3. Estadiamento do melanoma

O sistema de estadiamento do melanoma é clinicamente importante porque possibilita categorizar os pacientes em diferentes grupos em termos de prognóstico. Isso propicia o direcionamento para o tratamento mais adequado, o acompanhamento da resposta terapêutica e a avaliação do risco de recorrência (Dickson; Gershenwald, 2011).

Durante muitos anos, os tumores eram classificados de acordo com os níveis de Clark, que descrevem o grau de invasão tumoral através das camadas da pele (Balch et al., 2001). Existem cinco níveis: a) nível I: quando a lesão encontra-se restrita na epiderme (melanoma *in situ*); b) nível II: quando atinge a derme papilar, sem ultrapassá-la; c) nível III: quando o tumor cresce verticalmente, atingindo o limite entre a derme papilar e a derme reticular; d) nível IV: quando infiltra a derme reticular; e) nível V: quando o tumor invade a hipoderme (Mervic, 2012a).

Estudos tem demonstrado que os níveis de invasão de Clark apresentam menor reprodutibilidade entre os patologistas e possuem menor precisão no fornecimento de informação prognóstica em comparação com outros fatores de categorização. Assim, na versão mais atualizada do manual de estadiamento de melanoma do *American Joint Committee on Cancer- AJCC*, os níveis de Clark apresentam menor relevância (Balch et al., 2001; Balch et al., 2009b).

No manual da AJCC a classificação TNM (tumor - linfonodo - metástases) é usada para estadiar melanoma (Balch et al., 2009a). Os fatores mais importantes para o estadiamento são: a espessura do tumor (espessura de Breslow), o aparecimento de ulceração microscópica e a taxa mitótica (Mervic, 2012b). Além disso, nessa nova versão ocorreu a inclusão formal da avaliação imuno-histoquímica para a detecção de micrometástases nodais, onde pelo menos um marcador específico para melanoma deve ser utilizado, como por exemplo, HMB-45, Melan-A ou MART 1 (Balch et al., 2009a; Dickson & Gershenwald, 2011).

A espessura de Breslow mensura (em milímetros) a distância entre a camada superior da epiderme e o ponto mais profundo da penetração do tumor. Há uma relação inversa entre a espessura tumoral e o prognóstico: quanto mais espesso o melanoma, menor a taxa de sobrevida. Portanto, a espessura de Breslow é considerada um dos

fatores mais significativos na previsão da progressão da doença (Balch et al., 2001; Balch et al., 2009a).

De acordo com a espessura, os melanomas podem ser definidos como finos ($< 1\text{mm}$), de espessura intermediária (ente 1 e 4 mm) e espessos ($> 4\text{mm}$). Os pacientes portadores dos melanomas finos são considerados de baixo risco, visto que raramente haverá metastatização. Já os que possuem melanomas espessos apresentam elevado risco de recorrência e baixa sobrevida (Dickson; Gershenwald, 2011; Mervic, 2012).

A ulceração consiste na perda de continuidade da derme sobre o tumor primário. Vários estudos demonstram que a presença de ulceração representa um fenótipo tumoral mais agressivo, com maior probabilidade de metástase e pior prognóstico (Balch et al., 2001; Spatz et al., 2003).

A atividade mitótica (por mm^2) consiste na medida de proliferação do tumor primário. Evidências apontam que, quando avaliada na fase de crescimento vertical, é um dos fatores preditivos de sobrevida mais relevantes. Além de informações prognósticas, a determinação da taxa mitótica também é importante para o planejamento da extensão da cirurgia (Barnhill et al., 2005; Elder et al., 2005; Thompson et al., 2011).

Na classificação TNM, as categorias de estadiamento são: T (baseada no tamanho tumoral), N (presença de metástases nos linfonodos regionais) e M (presença de metástases em sítios distantes). Estas são agrupadas em estádios, com base nos fatores relacionados com a sobrevida (Balch et al., 2009b; Mervic, 2012a). Assim, os preditores de sobrevida em pacientes com melanomas nos estádios I e II (tumor localizado sem evidência de metástase) são a espessura de Breslow, a presença ou ausência de ulceração e o índice mitótico. Os preditores de sobrevivência na doença em estágio III, que representa pacientes com metástases nodais, são o número total de nódulos metastáticos, a carga tumoral (que é empiricamente dividida em micrometástases e

macrometástases) e a ulceração do tumor primário. No melanoma estágio IV, que inclui pacientes com doença metastática, o preditor é a localização de metástases distantes (Balch et al., 2009a; Dickson & Gershenwald, 2011; Mervic, 2012b). Na tabela 1 estão as categorias de estadiamento TNM para melanoma cutâneo.

Tabela 1: Classificação TNM do melanoma cutâneo classificado em relação à extensão do tumor (T), presença ou ausência de linfonodos regionais (N) e de metástase (M) (Santos, 2005).

Tumor Primários (T)		
Classificação	Breslow (mm)	Ulceração/Mitoses
<i>T_{in situ}</i>	Não se aplica	Não se aplica
T1	≤ 1,00	a: Sem ulceração e mitose < 1/mm ² b: Com ulceração ou mitose ≥ 1/mm ²
T2	1,01 - 2,00	a: Sem ulceração b: Com ulceração
T3	2,01 - 4,00	a: Sem ulceração b: Com ulceração
T4	> 4,00	a: Sem ulceração b: Com ulceração

Metástases nodais		
N	Número de linfonodos com focos metastáticos	Metastática nodais
N0	0	NA
N1	1	a: Micrometástases* b: Macrometástases†
N2	2 a 3	a: Micrometástases* b: Macrometástases† c: Metástase em trânsito/ satelitoses, sem linfonodo metastático
N3	≥ 4 linfonodos metastáticos, linfonodos confluentes ou metástase em trânsito/ satelitoses com linfonodos metastáticos	

M	Metástases à distância	
	Local	LDL
M0	Ausente	-
M1a	Pele, subcutâneo ou linfonodos metastáticos distantes	Normal
M1b	Metástase pulmonar	Normal
M1c	Todas as outras metástases viscerais	Normal
	Metástases a distância	Elevado

* Micrometástases são diagnosticadas após a biópsia de linfonodo sentinela.

† Macrometástases são definidas como linfonodos metastáticos detectados clinicamente e confirmados histopatologicamente.

1.4. Marcadores sorológicos do melanoma

Diversos candidatos têm sido estudados como possíveis marcadores sorológicos para o melanoma cutâneo, tais como: as enzimas lactato desidrogenase (LDH), a tirosinase, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), osteopontina, YKL-40, S100 e a IL-8 (Karagiannis et al., 2015).

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica, tetramérica e pertencente à família 2- hidroxí ácido oxidoreductase. Seu papel é aumentar a taxa de inter-conversão simultânea de piruvato para lactado e de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD)H para NAD⁺. A LDH é predominantemente envolvida na glicólise anaeróbia e aeróbia (efeito Warburg); contudo, apresenta múltiplas funções adicionais em tecidos normais e tumorais, ainda não bem elucidadas (Valvona et al., 2015). A LDH é um biomarcador sorológico para melanoma cutâneo, sendo liberada após danos ou morte celulares, consistindo, deste modo, em um indicativo de evolução da doença (Solassol, et al., 2011). Entretanto, o aumento da LDH no soro não é específico para malignidade, pois também pode ocorrer em muitos outros contextos celulares, tais como hemólise, infecção, infarto

e inflamação. Contudo, trata-se de uma ferramenta útil para indicar a progressão tumoral em pacientes com melanoma em estágio avançado; inclusive, foi incluída no sistema de classificação TNM (Solassol, et al., 2011; Karagiannis et al., 2015).

A enzima tirosinase faz parte do processo de biossíntese da melanina e é constitutivamente expressa em melanócitos e nas células de melanoma. Estudos demonstram que níveis elevados de mRNA da tirosinase podem ser detectados no sangue de pacientes com melanoma metastático, por RT-PCR. Entretanto, o valor prognóstico deste marcador ainda está sendo investigado, pois uma grande variabilidade tem sido relatada em estudos envolvendo pacientes com melanoma metastático (Karagiannis et al., 2015).

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um potente fator angiogênico, o qual foi descrito pela primeira vez como um fator de crescimento essencial para as células endoteliais vasculares. O VEGF está superexpresso em muitos tipos de tumores e a sua contribuição para o processo de angiogênese, proliferação e metástase é amplamente conhecido. O VEGF é produzido por vários tipos celulares e compreende seis proteínas diferentes, incluindo: fator de crescimento placentário, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF (VEGF-E). Estudos têm apontado que o VEGF não é expresso em melanócitos normais, mas encontra-se superexpresso em células de melanoma, onde existe uma correlação com a progressão do melanoma metastático (Rajabi et al., 2012).

Osteopontina (OPN) é uma glicoproteína que foi identificada pela primeira vez no ano de 1986, em osteoblastos. A OPN é uma proteína multifuncional, presente na matriz extracelular e composta de ~ 300 resíduos de aminoácidos, com aproximadamente 30 resíduos de hidratos de carbono, incluindo dez resíduos de ácido siálico (Sase et al., 2012). Esta proteína tem sido relacionada com a

diminuição da apoptose e o favorecimento do crescimento tumoral. Recentemente, foi demonstrado que a associação da OPN com a proteína S100B está correlacionada com o aumento da susceptibilidade de recidiva e progressão metastática no melanoma (Bandopadhyay et al., 2014; Becker et al., 2009).

YKL-40, também denominada glicoproteína-39 da cartilagem humana (HC gp-39), é secretada por muitos tipos celulares, incluindo células tumorais e do sistema imunológico (tais como macrófagos e neutrófilos ativados). Estudos evidenciam que a detecção elevada desta proteína em pacientes com mau prognóstico pode ser resultante da interação entre os macrófagos no microambiente tumoral e as células de melanoma (Krogh et al., 2016).

A família de proteínas S100 é composta por 21 membros que apresentam semelhança estrutural, mas não são funcionalmente intermutáveis. Esta família modula as respostas celulares, funcionando como sensores intracelulares de Ca^{2+} e de fatores extracelulares. Estudos *in vivo* demonstram que estas proteínas estão envolvidas em diversos processos tumorigênicos, tais como: proliferação celular, metástase, angiogênese e evasão imunológica. As proteínas S100 têm sido amplamente estudadas na última década como marcadores para o melanoma, pois a expressão e secreção destas encontram-se significativamente aumentadas nas células tumorais (Bresnick et al., 2015).

A interleucina-8 (IL-8), também conhecida como CXCL8, é uma quimiocina produzida por células tumorais e está associada a respostas inflamatórias. Estudos recentes têm mostrado que IL-8 está relacionada com a carga tumoral, estadiamento, sobrevida e a resposta frente a alguns agentes terapêuticos, como os inibidores de BRAF (Karagiannis et al., 2015).

1.5. Tratamento do melanoma

A conduta terapêutica é baseada, sobretudo, de acordo com o estadiamento da doença. Nos estágios iniciais, o principal tratamento é cirúrgico. Havendo a presença de metástases, pode ser realizada terapia adjuvante com interferon, administração de radioterapia e tratamento com quimioterapia (Ethun; Delman, 2016; Fava et al., 2017).

Os quimioterápicos mais utilizados no tratamento do melanoma maligno são a dacarbazina (DTIC), cisplatina (CDDP), nitrosuréias (carmustina e lomustina) e agentes que atuam sobre os microtúbulos (alcaloides da Vinca e taxanos) (Locatelli et al., 2013). A dacarbazina é o quimioterápico padrão, consistindo na única droga citotóxica que tem gerado taxas consistentes de resposta, variando de 20 a 25%; entretanto esta resposta é parcial. As outras drogas citadas não mostraram superioridade comparada à dacarbazina (Hsan et al., 2010; Locatelli et al., 2013).

A radioterapia no tratamento do melanoma cutâneo é limitada, apresentando relação direta entre a dose empregada e a extensão e localização do tumor. Esta modalidade é indicada, principalmente, para o tratamento paliativo de metástases sintomáticas nos ossos e cérebro (Locatelli et al., 2013).

As opções para o tratamento do melanoma em estágio avançado evoluíram significativamente em um curto período de tempo, sobretudo nos tumores que apresentam mutações no gene BRAF (Singh et al., 2017). O melanoma metastático ainda é considerado uma doença devastadora. Até o ano de 2011 a conduta terapêutica padrão, que consistia na quimioterapia com a dacarbazina e na imunoterapia com interleucina-2, a sobrevida global média dos pacientes era de nove meses (Luke; Schwartz, 2013; Luke et al., 2017). Além disso, estes tratamentos apresentam

importantes limitações, como baixa taxa de resposta (inferior a 15%) e toxicidade grave (Finn et al., 2012).

Em decorrência de várias décadas de pesquisa sobre a genômica dos tumores e os princípios fundamentais da resposta imune contra o câncer, desde 2011 até o presente momento vários medicamentos foram aprovados pelo FDA para o tratamento do melanoma metastático (Luke et al., 2017; Luo; Shen, 2017). Estes tratamentos são: a) terapia alvo-específica com inibidores de BRAF e MEK; b) imunoterapia com os anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD1 e c) terapia viral oncolítica com o vírus do herpes T-VEC. Os estudos clínicos demonstraram que sobrevida global média dos pacientes aumentou para pelo menos dois anos (Chapman et al., 2011; Callahan; Wolchok, 2013; Saito et al., 2015; Millet et al., 2017). No entanto, apesar da menor eficácia, a quimioterapia continua sendo o padrão de tratamento, por questões econômicas e de acessibilidade/disponibilidade.

Existe uma heterogeneidade substancial na progressão do melanoma. Um terço dos pacientes manifestam uma doença multifocal e de evolução rápida quando o melanoma metastático é detectado pela primeira vez (Singh et al., 2017). Tais pacientes, no geral, são incapazes de obter remissões duradouras mesmo com os tratamentos mais avançados. Além disso, subsiste o sério problema de resistência secundária, visto que as células de melanoma apresentam alta instabilidade genômica e capacidade de adaptar-se em microambientes desfavoráveis (Saito et al., 2015; Millet et al., 2017). Aliado a esse cenário, existe uma problemática relacionada a custos e acessibilidade ao tratamento com as novas terapias. Assim, apesar da quimioterapia ser menos eficaz, esta modalidade continua exercendo um papel central no tratamento do melanoma metastático (Luo; Shen, 2016). Deste modo, o desenvolvimento de estratégias multimodais, incluindo radiação, cirurgia e quimioterapia, bem como a combinação de

abordagens terapêuticas (moleculares e imunológicas), são indispensáveis para os avanços na clínica e a disponibilização de terapias eficazes e acessíveis (Ascierto et al., 2016; Luk et al., 2017).

1.6. Infusão Transdérmica de Fármacos (ITDF)

1.6.1. Estrutura da pele

A pele é o maior órgão do corpo, constituindo cerca de 16% da massa corporal. Ela é estruturada em duas camadas primárias, a epiderme e a derme, as quais são constituídas por componentes epiteliais, mesenquimais, glandulares e neurovasculares (Figura 3). Dentre as várias funções da pele, a principal é a de revestimento e proteção (D'Orazio et al., 2013).

A epiderme, de origem ectodérmica, consiste na camada mais externa da pele, sendo ponto de contato do corpo com o meio ambiente. As características biológicas e físicas desta propiciam uma função relevante na proteção frente a fatores ambientais agressivos (tais como luz UV), agentes patogênicos infecciosos e substâncias químicas. (Slominski et al., 2012). A epiderme é organizada em camadas funcionais, definidas majoritariamente pelas características de queratinócitos (tais como tamanho, forma, nucleação e expressão de queratina). Estas camadas são: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo (camada mais externa) (Sharma et al., 2011).

Figura 3: Estrutura da pele. Adaptado de: Sharma et al., 2011.

Os queratinócitos epidérmicos, oriundos da divisão celular das células-tronco no estrato basal, à medida que migram em direção à superfície da pele para formar os corneócitos, sofrem diversos processos de diferenciação, os quais envolvem enucleação e acúmulo de queratina (Chua et al., 2016). Os queratinócitos também recebem melanina, a partir de melanócitos (Nordlund et al., 2007). Os corneócitos são células mortas, mas intactas, fortemente ligadas entre si por desmossomos e junções comunicantes para formarem a barreira mais externa da epiderme, o estrato córneo (Sharma et al., 2011).

O estrato córneo contém cerca entre 10 a 25 camadas de corneócitos, sendo composto por proteínas (79 – 90%) e lipídeos (5 – 15%). Ele é flexível, mas relativamente impermeável, consistindo no principal obstáculo à penetração cutânea de fármacos (Marwah et al., 2016).

A derme, derivada do mesoderme, está subjacente à epiderme e abriga os folículos pilosos, nervos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. A derme é

composta, majoritariamente, de tecido conjuntivo contendo células imunes e fibroblastos. O suprimento sanguíneo nessa camada tem função essencial na regulação da temperatura corporal, no fornecimento de nutrientes e de oxigênio e na remoção de toxinas (Shama et al., 2011).

A hipoderme ou tecido adiposo subcutâneo funciona como suporte mecânico e nutricional para a derme e a epiderme. Além de servir como depósito de gordura, esta camada auxilia na regulação da temperatura. Abriga os principais vasos sanguíneos e nervos da pele. Apresenta importância na administração transdérmica de fármacos, visto que, para atingir a circulação sistêmica, este deve atravessá-la (Slominski et al., 2012; Marwah et al., 2016).

1.6.2. Permeação cutânea de fármacos

Os fármacos podem permear a pele por intermédio de três vias (Figura 4) (Marwah et al., 2016; Zaleski-Larsen; Fabi, 2016):

- Intercelular ou paracelular: a molécula difunde-se através da matriz lipídica, entre os corneócitos. Constitui a principal forma de passagem de substâncias lipofílicas (Ghaffarian; Muro, 2013);
- Intracelular ou transcelular: a molécula passa através dos corneócitos, por meio dos transportes ativo e passivo, endocitose e transcitose, consistindo na principal forma de passagem de substâncias hidrofílicas. Quando ocorre a formação de um poro aquoso, esse é resultado da degradação dos corneodesmossomas. Métodos como ultrassom e ionoforese podem aumentar essa forma de permeação (Sharma et al., 2011; Parnami et al., 2014).

- Transapêndices: a permeação ocorre através dos folículos pilosos e glândulas (Sharma et al., 2011).

Figura 4: Vias de permeação cutânea. Adaptado de: Marwah et al., 2016.

Estudos tem demonstrado que o folículo piloso é um alvo relevante para a administração tópica de fármacos. Além de ser facilmente acessível, apresenta uma diversidade de estruturas que são de interesse terapêutico, tais como o infundíbulo circundado por capilares sanguíneos, células apresentadoras de antígeno e a glândula sebácea (Patzelt; Lademann, 2013; Fang et al., 2014).

A rede de capilares sanguíneos ligada aos folículos propicia que as moléculas administradas penetrem no infundíbulo e atinjam rapidamente a circulação sanguínea, evitando assim a barreira do estrato córneo (Schaefer; Lademann, 2001). Assim, a administração via folículo piloso permite um rápido acesso do fármaco às camadas mais profundas da pele e maior biodisponibilidade (Luther et al., 2012; Patzelt; Lademann, 2013). Além disso, os folículos pilosos podem atuar como um reservatório de fármacos (Knorr et al., 2009).

A administração de fármacos através dos folículos pilosos depende de diversos aspectos, sendo influenciada pelas propriedades físico-químicas do fármaco e pela densidade dos folículos em diferentes locais do corpo (Otberg et al., 2004; Vogt et al., 2005).

Recentemente foi demonstrado que a deposição de minoxidil em apêndices cutâneos como os folículos pilosos contribuem para a penetração do minoxidil na circulação sanguínea (Grice et al., 2010). Os resultados do estudo de Blume-Peytavi e colaboradores (2010) evidenciaram que a permeação do Minoxidil pela via transapêndices consiste em um fator crucial para o crescimento capilar promovido pela ação do fármaco.

Diversos fatores influenciam a permeação cutânea dos fármacos (Marwah et al., 2016):

- a. Propriedades físico-químicas da molécula: coeficiente de partição, coeficiente de difusão, tamanho, solubilidade, ponto de fusão e grau de ionização (Dhote et al., 2012; Park et al., 2012);
- b. Propriedades físico-químicas do método de entrega de fármacos (Rehman; Zulfakar, 2014; Schoellhammer et al., 2014);
- c. Propriedades fisiológicas da pele (de acordo com a idade, raça, temperatura, pH na superfície e suprimento sanguíneo) (Jones; Moss, 2010; Subedi et al., 2010).

1.6.3. Administração transdérmica de fármacos

A pele é o órgão mais facilmente acessível do corpo humano, sendo um local para a aplicação de fármacos visando a obtenção tanto de efeitos locais quanto

sistêmicos (Sharma et al., 2011). A via de administração transdérmica constitui em uma alternativa às vias intravenosa e oral. Entre as vantagens desta via, destacam-se (Durand et al., 2012; Singh et al., 2012; Marwah et al., 2016):

- Entregar o fármaco diretamente no tecido-alvo;
- Evitar a degradação do medicamento no estômago;
- Impedir o efeito de primeira passagem pelo fígado, o qual poderia resultar na inativação de moléculas ou na geração de compostos tóxicos. Como resultado, pode haver o aumento da biodisponibilidade e a redução da toxicidade;
- Proporcionar níveis plasmáticos estáveis;
- Não ser invasiva, facilitando a adesão;
- Consistir na via mais adequada para pacientes inconscientes e com dificuldades de deglutição, bem como nos casos de vômito e/ou diarreia;
- Permitir a rápida interrupção do efeito dos fármacos, se desejável, com a sua remoção;
- Reduzir risco de overdose.

Entretanto, a pele, majoritariamente o estrato córneo, apresenta uma formidável barreira à penetração de medicamentos, limitando assim a disponibilidade tópica e transdérmica. Visando aumentar os efeitos locais de fármacos na pele e contornar os aspectos farmacodinâmicos e farmacocinéticos indesejáveis quando estes são administrados por outras vias, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para maximizar a permeação cutânea de fármacos (Subedi et al., 2010; Schoellhammer et al., 2014;). Vários métodos mecânicos, físicos e químicos reduzem a função de barreira da pele e/ou aumentam o coeficiente de partição do fármaco por intermédio dos seguintes mecanismos (Csizmazia et al., 2012; Marwah et al., 2016):

- a. alteração das propriedades físico-químicas do estrato córneo;

- b. modificação das propriedades de hidratação do estrato córneo;
- c. interação com lipídeos e proteínas intra e intercelulares;

1.6.4 Gerações de sistemas de infusão transdérmica de fármacos

Segundo Prausnitz e Langer et al. (2008), existem 3 gerações de sistemas de infusão transdérmica de fármacos:

A) Primeira geração:

Corresponde a maioria dos adesivos transdérmicos de uso clínico. Nesse sistema são utilizados fármacos que possuem propriedades muito particulares, tais como baixo peso molecular, caráter lipofílico e eficácia mesmo em baixas doses. O transporte das moléculas ocorre pela via intercelular, sendo dependente da solubilidade na matriz lipídica (Guy, Hadgraft, 2003; Prausnitz, et al., 2004; Prausnitz et al., 2008; Swain et al., 2011). Deste modo, a entrega transdermal destes é limitada, principalmente, pela barreira formada pelo estrato córneo.

B) Segunda geração:

Contempla estratégias que melhoram a permeação cutânea, aumentando o escopo de possíveis tratamentos. É representada pelo uso de forças motrizes para o transporte transdérmico, como o ultrassom e a iontoforese. No entanto em tais métodos a maior dificuldade é manter o equilíbrio entre a permeação através do estrato córneo e a proteção exercida pelos tecidos mais profundos. Esta segunda geração de sistemas ganhou destaque na prática clínica, sobretudo, por propiciar o aumento da entrega de substâncias de baixo peso molecular e facilitar a permeação de fármacos, carregados ou não, pela via intracelular. No entanto, trouxe pouco impacto na penetração de

macromoléculas e fármacos insolúveis em água (Guy, Hadgraft, 2003; Prausnitz, et al., 2004; Prausnitz et al., 2008; Swain et al., 2011; Kumar et al., 2013).

A iontoforese (Figura 5) normalmente é realizada com a aplicação de uma corrente contínua de baixa tensão. Baseia-se no aumento da permeabilidade por gerar uma corrente elétrica que cruza o estrato córneo. Drogas carregadas eletricamente são movidas via eletroforese, enquanto que as fracamente carregadas e as sem carga elétrica são movidas pelo fluxo eletro-osmótico de água, gerado pelo movimento de cátions e ânions no estrato córneo. Devido ao fato de a iontoforese não mudar primariamente a barreira cutânea, é utilizada apenas para pequenas moléculas carregadas eletricamente ou macromoléculas com poucas centenas de Daltons (Karande et al., 2005; Dhote et al., 2012).

Figura 5: Técnica de iontoforese. Adaptado de Marwah et al., 2016.

O ultrassom (Figura 6) foi o primeiro método largamente reconhecido para aumentar a permeação cutânea de fármacos. Este efeito foi descoberto quando

fisioterapeutas perceberam que as massagens realizadas com agentes anti-inflamatórios apresentavam melhor resultado quando havia posterior aplicação do ultrassom, em comparação com mesmo procedimento sem o uso deste agente físico (Machet, Boucaud, 2002; Pikal, 2001). Ultrassom consiste em ondas mecânicas que oscilam com frequências muito altas ao ponto de seres humanos não conseguirem escutar. Seu efeito predominate é o de romper a estrutura lipídica do estrato córneo e, assim, aumentar a permeabilidade. Também podem formar bolhas que geram poros pelos quais passam proteínas e vacinas (Marwah et al., 2016). No entanto, este resultado só é obtido com o uso de moléculas de baixo peso molecular e de caráter lipofílico (Karande et al., 2005; Dhote et al. 2012).

Figura 6: Técnica de ultrassom. Adaptado de Marwah et al., 2016.

c) Terceira geração:

É composta por tecnologias que possibilitam a permeação de macromoléculas no estrato córneo. O objetivo é promover uma ruptura significativa desta barreira, proporcionando maior efeito de penetração transdérmica, sem haver interação com os

tecidos mais profundos. Neste sentido, as microagulhas, a ablação termal e os dispositivos de microinjeção são os métodos mais efetivos para essa entrega transcutânea, podendo ser utilizadas para a administração de macromoléculas, drogas lipofílicas, proteínas terapêuticas e vacinas.

Uma infusão transdérmica eficaz e segura deve ser baseada na obtenção do equilíbrio entre a entrega efetiva dos fármacos e a segurança do procedimento. Alguns sistemas de terceira geração têm sido bem tolerados para esta finalidade, especialmente os sistemas que utilizam microagulhas injetoras (Figura 7) e ablação térmica (Prausnitz et al., 2008; Swain et al., 2011; Kumar et al., 2013; Sirsi et al., 2014).

Figura 7: Sistema de ITDF utilizando microagulhas, com controle digital.

No presente estudo escolheu-se como método de infusão transdérmica a ablação térmica, realizada por meio de dispositivo de radiofrequência fracionada para a infusão de etoposídeo, empregado no tratamento do melanoma maligno cutâneo.

1.7. ITDF por ablação térmica utilizando dispositivo de radiofrequência

A radiofrequência (RF) é o conjunto de radiações eletromagnéticas que oscilam simultaneamente no campo elétrico e magnético (Gold et al., 2007). Possuem frequências extremamente amplas, podendo variar de 3Khz à 300 GHz. A RF promove o aquecimento tissular de duas maneiras: resistência do tecido à passagem dos elétrons (impedância) – RF resistivo, ou fricção ocasionada pela rotação das moléculas de água no campo eletromagnético – RF capacitiva.

No espectro eletromagnético, a RF possui comprimentos de onda muito altos - acima de 10^6 nm (Figura 8). (Sintov et al., 2003; Gherardini et al., 2014; D'Agostino et al., 2014). Quanto à polaridade, existem várias modalidades de radiofrequência: monopolar, unipolar, bipolar, tripolar ou multipolar, monopolar multifocal, fracionada e microagulhada.

Figura 8: Espectro eletromagnético e os diferentes lasers, com seus comprimentos de onda.

1.7.1. Monopolar

A movimentação iônica ocorre no sentido do polo positivo em direção ao negativo (terra), onde o calor é gerado com maior intensidade no ponto de entrada (Figura 9). Neste modelo, ocorre a circulação de elétrons pelo corpo humano. Possui grande capacidade termogênica, porém pouco ou nenhum controle sobre a profundidade da penetração (Dendle et al., 2016).

Figura 9: Esquema da RF monopolar.

1.7.2. Unipolar

Nesta modalidade existe apenas o polo positivo, não havendo a necessidade de fio terra. A geração de calor ocorre por meio da indução de movimentos rotacionais das moléculas de água, sem a passagem de corrente elétrica pela pele (RF capacitiva). Funciona similarmente a uma antena de rádio (Figura 10). Neste modelo há grande dificuldade de se controlar a profundidade da penetração. Por não haver passagens de elétrons, necessita-se de alta energia para geração do efeito térmico. Possui ação profunda (Beasley; Weiss, 2014).

Figura 10: Esquema da radiofrequência unipolar.

1.7.3. Bipolar

Trabalha com eletrodos negativos e positivos no mesmo local de ação. Não há necessidade de fio terra (Figura 11). A circulação de elétrons é apenas local. Tem ação mais superficial (Divaris et al., 2014).

Figura 11: Esquema da radiofrequência bipolar.

1.7.4. Tri ou multipolar

Esta modalidade representa a evolução do modo bipolar. Nela são utilizados 3 ou mais eletrodos (Figura 12) que emitem elétrons entre si. A passagem de elétrons ocorre nos dois sentidos, sendo que hora um eletrodo se comporta como positivo e hora como

negativo. Nunca um elétron parte de um polo e chega a dois outros; portanto, apresenta um comportamento bipolar com intensa alternância de polaridade. A corrente elétrica sempre varia entre local de saída e o ponto de chegada. Isso faz com que a energia disponibilizada na superfície da pele seja mais homogênea e melhor distribuída. Este tipo de tecnologia possui ação dérmica e epidérmica, ao mesmo tempo (Krueger; Sadick, 2013).

Figura 12: Esquema da radiofrequência multipolar. (A) Vista lateral; (B) Vista sagital.

1.7.5. Monopolar Multifocal

Esta tecnologia monopolar apresenta apenas um polo positivo fragmentado em numerosos eletrodos, de tal forma que os elétrons caminham sempre de forma uniforme para um mesmo eletrodo negativo. Isso torna o aquecimento totalmente homogêneo, ao longo da placa de aplicação (Figura 13). Desta forma, é possível, com apenas poucos disparos, elevar a temperatura cutânea para a temperatura de trabalho (40-42°C). Esta tecnologia tem ação predominantemente na junção dermo-epidérmica, com pouco ou nenhum efeito no subcutâneo. É utilizada basicamente no tratamento da flacidez (Hodgkinson, 2009).

Figura 13: Esquema da radiofrequência Monopolar Multifocal. (A) Vista lateral; (B) Vista sagital.

1.7.6. Fracionada

Esta tecnologia concentra a energia da RF em pequenos eletrodos pontuais, produzindo colunas de ablação e coagulação na epiderme e na derme a depender da energia utilizada, sem atingir o subcutâneo (Figura 14). Este processo cria vários microcanais, referidos como zonas microscópicas de tratamento. Por tais microcanais, diversas moléculas podem passar em direção as camadas mais profundas da pele (Akita et al., 2014; Zaleski-Larsen & Fabi, 2016).

A RF fracionada é bipolar, sendo que o polo negativo centrífugo atrai os elétrons e faz com que as colunas de tecido coagulado sejam mais grossas na profundidade do que na superfície. Deste modo, a maior parte da área superficial da pele permanece intacta e não tratada. Esta região funciona como reservatório de células tronco, fatores de crescimento e células inflamatórias, as quais são capazes de rapidamente migrar para a pele traumatizada e facilitar a cicatrização (Akita et al., 2014; Zaleski-Larsen & Fabi, 2016).

Figura 14: RF fracionada. (A) Imagem do eletrodo; (B) Representação esquemática da pele.

1.7.7. Microagulhada

A RF microagulhada representa uma nova modalidade de tratamentos microinvasivos. Microagulhas banhadas à ouro penetram até profundidades pré-determinadas podendo ser na epiderme, derme ou até hipoderme. Há diferentes modalidades de microagulhas, podendo ser isoladas, emitindo elétrons apenas nas pontas, ou não isoladas, emitindo elétrons em toda extensão das hastes. Referente à polaridade são sempre bipolares podendo haver alternância de polaridades (Pudukadan D. – 2017).

Figura 15: RF microagulhada. Representação esquemática do sistema de RF microagulhada com agulhas isoladas perfazendo pontos de coagulação na derme.

1.8. O ciclo celular

O ciclo de divisões da maioria das células compreende uma sequência complexa de eventos que garantem a transmissão correta, para as células filhas, de uma cópia completa do genoma. Estes eventos possibilitam que as células cresçam e se dividam (Palmisano et al., 2017). O estímulo inicial é oriundo da presença de fatores de crescimento, os quais se ligam a receptores presentes na membrana celular para desencadear a liberação de fatores de transcrição, impulsionando a célula pelo ciclo celular (Harper; Brooks, 2005)

O ciclo celular é dividido em dois estágios: mitose (M), onde ocorre a divisão celular, e a intérfase, que corresponde ao intervalo entre duas fases M. A intérfase é composta pelas fases G_1 , S e G_2 . As células que irão replicar movem-se da fase G_0 (célula em repouso) para a fase G_1 , onde a célula produz o RNA (ácido ribonucleico) e as proteínas necessárias para a síntese do DNA. O balanço entre sinais proliferativos e de inibição da proliferação em G_1 irão determinar se o ciclo vai progredir para a fase S, onde se inicia a replicação ou síntese do DNA. A fase S é seguida por G_2 , onde as células se preparam para entrar na mitose e se dividir (Malumbres; Barbacid, 2009; Palmisano et al., 2017).

Figura 16: Ciclo celular e pontos de checagem. Adaptado de Lombardi e Lasagni, 2010.

Entre as fases do ciclo celular existem pontos de checagem que asseguram a correta progressão das células através destas. Tal controle é feito por uma subfamília de quinases dependentes de ciclinas (CDKs), cuja ativação depende da interação com as ciclinas (Kastan; Bartek, 2004; Bartek; Lukas, 2007). Portanto, a atividade de cada CDK é regulada pelos níveis da sua ciclina e também pela expressão de inibidores específicos das CDK (Visconti et al., 2016).

A passagem pelo ponto de restrição em G_1 é regulada, majoritariamente, por complexos de CDK4 e CDK6 com as ciclinas do tipo D. A ligação da ciclina E com a quinase CDK2 é importante para a transição G_1 -S e para o início da duplicação do DNA. Os complexos CDK2-ciclina A também contribuem para o início da síntese do DNA e a progressão das células através da fase S. A transição G_2 -M depende da

interação da CDK1 e a ciclina B (Figura 15) (Errico; Costanzo, 2012; Visconti et al., 2016).

Danos ao DNA e outros insultos genotóxicos que comprometam a estabilidade do genoma levam a ativação de p53, resultando em parada do ciclo celular e na ativação de mecanismos de reparo no DNA (Jackson; Bartek, 2009; Yoshida; Miki, 2010). Se os danos ao DNA não forem reparados ocorrerem falhas nos pontos de checagem e as células entram em apoptose (Malumbres; Barbacid, 2010).

1.9. Alterações mitocondriais na apoptose

Os mecanismos de indução e execução do processo apoptótico são altamente complexos e sofisticados. As duas principais vias de iniciação da apoptose são: intrínseca ou mitocondrial e extrínseca ou dos receptores de morte. Essas vias convergem para a fase de execução da apoptose, que é mediada, principalmente, pelas caspases efetoras (Plati et al., 2011; Green; Llambi, 2015).

A mitocôndria é a principal organela envolvida no processo apoptótico. A via intrínseca é desencadeada por uma diversidade de estímulos, como luz ultravioleta, espécies reativas de oxigênio, ação de agentes citotóxicos e danos ao DNA (Bratton; Salvesen, 2010; Pradelli et al., 2010). As cascatas de sinalização celular ativadas por esses agentes promovem alterações na membrana mitocondrial interna, resultando na perda do potencial transmembrânico mitocondrial (despolarização da mitocôndria), abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT) e liberação de várias proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembrana para o citosol, onde dois importantes grupos se destacam (Parsons; Green, 2010; Plati et al., 2011). O primeiro

consiste do citocromo C, Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI) e HtrA2/Omi (Non-methionine initiating protein/High-temperature requirement), que mediam a apoptose através da ativação de caspases. O segundo grupo é composto pela endonuclease G e AIF (Apoptosis Inducing Factor), que induzem eventos apoptóticos independentes das caspases (Green; Llambi, 2015; Kiraz et al., 2016).

A dissipação do potencial transmembrânico mitocondrial é um evento que acontece durante os estágios iniciais da morte por apoptose, antes da evidência de qualquer alteração morfológica (Pradelli et al., 2010). Alguns fluorocromos catiônicos e lipofílicos se acumulam na mitocôndria e a extensão dessa captação, avaliada pela intensidade de fluorescência, reflete as mudanças no potencial transmembrânico mitocondrial (Wlodkowic et al., 2012). Sendo assim, quanto mais despolarizada estiver a mitocôndria, menor a quantidade do fluorocromo que se acumula e menor a fluorescência da célula (Wlodkowic et al., 2009). Um dos fluorocromos mais utilizados neste tipo de ensaio é a rodamina 123, que pode ser usada sozinha ou em combinação com o iodeto de propídeo nos ensaios de citometria de fluxo (Perry et al., 2011; Wlodkowic et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia do sistema de infusão transdérmica, que utiliza radiofrequência fracionada em conjunto com o etoposídeo, no tratamento de camundongos C57BL/6J portadores de melanoma dorsal.

3. MÉTODOS

3.1. Animais de experimentação

Foram utilizados 60 camundongos isogênicos, machos, da linhagem C57BL/6J, com peso entre 26 a 28g e aproximadamente 4 meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Durante o procedimento experimental, os animais foram alimentados com ração peletizada para camundongos e água *ad libitum*, em ambiente com controle de temperatura (22 a 24°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. O manejo dos camundongos obedeceu às normas estabelecidas pela Comissão de Ética no uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB) e os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética do Instituto Butantan (CEUAIB), processo no. 927/12 (Anexo I) e da Coordenadoria de Ética em Pesquisa da FMUSP (CEP), processo número 152/15 (Anexo II)

3.2. Cultura da célula tumoral e inoculação nos animais

A linhagem de melanoma murino B16F10 (CRL 6475) foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, pH 7.0, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 2 mM de L-glutamina e 1% de antibióticos (10.000 UI/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina). Os frascos de cultura de 75 cm² foram mantidos em estufa para incubação de células com atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Após atingirem a confluência aproximada de 90%, as células foram subcultivadas para ampliação, realização de experimentos ou congelamento.

Antes da realização dos experimentos, as células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante azul de tripan (1%), que é excluído do citoplasma das

células viáveis que possuem membrana celular intacta. Apenas as células com viabilidade igual ou superior a 90% foram inoculadas nos animais.

3.3. Inoculação das células tumorais de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6J

Para inoculação das células tumorais, os camundongos machos C57BL/6J foram tricotomizados na área dorsal e pesados. Posteriormente, os animais foram submetidos à contenção manual e as células de melanoma B16F10 foram inoculadas na derme e no subcutâneo, na concentração de 10^4 em volume de 100 μ L, na área dorsal dos animais, utilizando-se seringa de 1 ml e agulha hipodérmica (13 x 0,30 mm) (Figura 17).

Figura 17: Desenho esquemático da inoculação das células tumorais do melanoma B16F10 na região dorsal dos camundongos. Fonte: Salomão et.al., 2016.

Semanalmente foram avaliados o peso corpóreo, o volume tumoral e o perfil hematológico. Após o período de tratamento (28 dias), os animais foram eutanasiados e coletou-se a massa tumoral e órgãos internos (pulmão, baço, rins, linfonodos e fígado). Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, cada um contendo 15 animais, conforme descrito abaixo.

3.4. Delineamento experimental

O seguinte fluxograma resume a metodologia e as análises que foram realizadas.

3.5. Avaliação do crescimento do tumor

Durante o período experimental, foram avaliados o crescimento tumoral e o peso dos animais. A verificação do crescimento tumoral foi realizada semanalmente pelas mensurações das dimensões de comprimento e largura das massas tumorais, mediante o uso de um paquímetro digital (Mitutoyo, mensuração 0,01 mm). Foi utilizada a fórmula para mensuração do volume tumorais, descrita abaixo.

$$\text{Volume do tumor (mm}^3\text{)} = [\text{comprimento (mm)} \times \text{Largura (mm)}]^2 / 2$$

3.6. Tratamento dos animais portadores de melanoma

No décimo dia após a implantação das células tumorais, os camundongos portadores de melanoma murino foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos experimentais de tratamento.

- Grupo 1: camundongos com tumor (n=15)
- Grupo 2: camundongos com tumor tratados com RF (n=15).

- Grupo 3: camundongos com tumor tratados com RF + etoposídeo sobre a massa tumoral (n=15).
- Grupo 4: camundongos com tumor tratados com etoposídeo em toda região dorsal (n=15).

O tratamento combinado consistiu na ablação térmica gerada pela RF fracionada (Duet RF – Eusung Corp - Coréia do Sul), utilizando-se tips fracionados 100 PIN, energia de 39,0 joules, duração do pulso de 0,4s, nível II sobre a área do tumor, sendo as sessões semanais, tendo início a primeira no 10º dia da implantação das células tumorais. A opção por este método de tratamento se deu por esta técnica gerar pontos de coagulação que podem servir como depósitos para a liberação gradual do fármaco (Figura 18).

Figura 18: Desenho esquemático mostrando o tratamento dos camundongos com a infusão transdérmica de etoposídeo sobre as massas tumorais. Fonte: Salomao et. al., 2016.

A aplicação do fármaco ocorreu imediatamente após o tratamento com RF, sendo um total de 5 doses, administradas nos dias 10°, 17°, 24°, 31° e 38° após o crescimento do tumor dorsal, ou seja, o protocolo terapêutico durou 28 dias. O quimioterápico etoposídeo foi aplicado na de concentração 1 mg/l, em um volume de 100µl.

No grupo tratado apenas com o quimioterápico a aplicação foi realizada sobre toda a região dorsal dos animais sendo que após foi realizado fricção manual para favorecer a penetração do ativo farmacológico.

3.7. Análise do perfil hematológico

O perfil hematológico dos animais pertencentes aos diferentes grupos de tratamento foi determinado nos 10°, 17°, 24°, 31° e 38° dias. As amostras de sangue periférico foram colhidas do plexo submandibular. Realizou-se a contagem direta de leucócitos totais (diluição 1/20 em solução de Turk), plaquetas (diluição 1/20 em oxalato de amônio) e eritrócitos (diluição 1/1000 em tampão fosfato-salino - PBS) em câmara de Neubauer. As contagens das porcentagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaço sanguíneo corados pelo método do panótico (metanol, eosina, hematoxilina), sendo 100% a quantidade de leucócitos totais obtidos pelo método direto.

Para a contagem do número de reticulócitos, foram utilizados 20 µL de sangue adicionados à 20 µL de corante azul de cresil brilhante. Posteriormente, as soluções resultantes foram incubadas em banho Maria a 37 °C por 20 minutos. Em seguida foram realizados os esfregaços e as leituras foram efetuadas em microscópio óptico. Os valores foram expressos em porcentagem média por campo.

3.8. Necropsia dos animais

Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados com a utilização de anestésicos (Cloridrato de cetamina 35 mg/ kg e Cloridrato de xilazina 80 mg/ kg), seguindo-se o deslocamento cervical (conforme artigo VI elaborado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA).

Durante a necropsia foram realizadas as avaliações macroscópicas dos órgãos e a coleta da massa tumoral e de fragmentos cutâneos adjacentes. As massas tumorais foram maceradas com solução de digestão e subsequentemente centrifugadas por 10 minutos (1400 rpm). Após este processo, o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de “Cold GM” (glicose 6,1 mM;; NaCl 137 mM;; KCl 4,4 mM;; 14 Na₂HPO₄ 1,5 mM; KH₂PO₄ 0,9 mM; EDTA 0,5 mM). Posteriormente, adicionou-se etanol absoluto (4°C) lentamente, sob agitação. O material foi acondicionado no freezer -20 até o momento das análises.

A cavidade abdominal e os órgãos internos (coração, pulmões, fígado, rins, linfonodos, baço, cérebro e placas de Peyer) foram observados macroscopicamente na busca de possíveis metástases. Em seguida os órgãos foram coletados, pesados e acondicionadas em tubos de coleta contendo formalina 10% (pH 7,4), para a realização das análises histopatológicas.

3.9. Análise das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

As células fixadas em álcool 70% foram centrifugadas, lavadas com PBS contendo 5 mM EDTA (Sigma Aldrich, EUA) e ressuspensas em tampão FACS para citometria

de fluxo (PBS com albumina bovina 0,5% e 2 mM de EDTA), contendo 18 µg/mL de iodeto de propídio (PI) (Sigma Aldrich, EUA) e 0,3 mg/mL de RNase-A. As células foram mantidas a temperatura ambiente durante 1h, no escuro. A leitura foi realizada por citometria (FASC Calibur BD, EUA), no canal FL2-H.

3.10. Análise do potencial elétrico da membrana mitocondrial

As massas tumorais coletadas foram maceradas com solução de digestão, centrifugadas durante 10 minutos (1400 rpm) e ressuspensas em 100 µL de tampão FACS (PBS com albumina bovina 0,5% e 2 mM de EDTA). Adicionou-se 5 µL de Rodamina 123 e JC-1 nas concentrações de 5 mg/mL, (Rh123- Molecular Probes), seguindo-se a incubação por 30 minutos, a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos (1500 rpm) e as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão FACS. A análise e aquisição das modificações do potencial transmembrânico mitocondrial foram realizadas em citometro de fluxo FACScalibur (BD), pela aquisição de 10.000 eventos nos canais de fluorescência FL-1 e FL-2.

A JC-1 (iodato de carbocianina tetraetilbenzimidazolil) é uma sonda catiônica, derivado da carbocianina, que se acumula nas mitocôndrias. Esse fluorocromo existe como monômero em baixas concentrações e produz fluorescência verde, por outro lado, em concentrações mais elevadas, essa sonda forma agregados “J” que exibem um espectro de excitação largo e um máximo de emissão a 590 nm. O procedimento de incubação com JC-1 foi seguido conforme descrito no protocolo da Abcam (ab113850 – JC1 - Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit).

3.11. Análise do processo autofágico LC-3 por citometria de fluxo.

Foi utilizado o anticorpo LC-3 do kit Muse TM Autophagy LC3 conjugado Alexa Fluor®555, que permitiu a discriminação entre a expressão citosólica e de autofagossoma.

As suspensões celulares das massas tumorais coletadas foram maceradas com solução de digestão e centrifugadas por 10 minutos (1500 rpm). A concentração celular ajustada para 5×10^5 células /mL. Em seguida foi adicionado 200 µL de solução de permeabilização (Solução A – CS 208212). Após 4 horas de incubação à temperatura ambiente, as células foram centrifugadas por 5 minutos (2500 rpm) e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 5 µL do anticorpo LC3-I (Solução B – CS 208215), havendo incubação por 1 hora à temperatura ambiente. O anticorpo não ligado foi removido pela lavagem por 2 vezes com tampão fosfato de sódio à 2500rpm e ressuspensas em 200µL e analisadas no citometro Muse Cell Analyser.

3.12. Análise histopatológica dos tumores e dos órgãos internos

As secções teciduais dos órgãos excisados fixados em formalina tamponada pH 7,4, foram resseccionadas para processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100%), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Em micrótomo os fragmentos foram seccionados em espessura de 5,0 µm e subsequentemente submetidos à coloração hematoxilina-eosina. Em seguida as lâminas foram escaneadas pelo sistema microscópico digital virtual VS110 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão). As imagens foram exibidas em um monitor LCD e as áreas de interesse foram escolhidas por meio

do programa Olyvia™ 2.3 Software (Olympus Corporation, Tóquio, Japão). As manifestações ocorridas no microambiente celular, como diferenciação celular, neoformação vascular, apoptose, necrose, regeneração tecidual, hemorragias entre outras, foram analisadas.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do peso dos animais

Os camundongos C57BL/6J portadores de melanoma dorsal foram tratados com diferentes estratégias terapêuticas: etoposídeo apenas, RF apenas ou com RF seguida da administração tópica de etoposídeo, durante 28 dias. Durante o período de tratamento todos os animais de todos os grupos tiveram seus pesos aferidos semanalmente.

Foi possível observar que houve uma diminuição significativa do peso médio dos animais do grupo RF durante a primeira semana de tratamento. Nas semanas seguintes, foi verificado um aumento de peso dos animais deste grupo chegando à uma média de $27.0g \pm 3g.$, número equivalente ao do grupo controle tumoral. Os camundongos tratados apenas com etoposídeo, na concentração de 1.0 mg/L, tiveram aumento do peso após o início do tratamento, havendo diminuição significativa após a segunda semana de tratamento (15º dia). Todos os animais deste grupo morreram durante a terceira semana de tratamento. Os animais do grupo tratados com RF associada ao etoposídeo sofreram redução do peso durante todo o período de tratamento, com peso médio final de 22.0g. A diminuição do peso corpóreo dos animais deste grupo provavelmente está correlacionada com a diminuição da massa tumoral (Figura 19).

Figura 19: Determinação do peso médio dos animais portadores de melanoma dorsal do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo ou com RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes.

4.2. Avaliação do volume tumoral

Os volumes dos tumores que se desenvolveram no dorso dos animais foram avaliados semanalmente. Nos animais do grupo controle foi possível observar que houve um aumento do volume tumoral durante o período do protocolo terapêutico, cujo valor médio foi de $5070 \pm 589 \text{ mm}^3$ no dia 28º (Figura 20). O volume tumoral do grupo RF aumentou a partir da primeira semana de tratamento, sendo o valor final de $4100 \pm 709 \text{ mm}^3$ (Figura 20). Os animais tratados apenas com etoposídeo apresentaram crescimento acentuado do volume tumoral, cujo valor foi de $3520 \pm 1130 \text{ mm}^3$ no dia 15º (Figura 20). Durante a terceira semana de tratamento todos animais deste grupo morreram, não sendo possível a avaliação do volume no 28º dia. No grupo RF + etoposídeo, verificou-se que o crescimento tumoral foi mais lento, em comparação com

os outros grupos, onde valor médio do volume de $3400 \pm 678 \text{ mm}^3$ no 28º dia (Figura 20).

Figura 20: Determinação do volume tumoral dos animais portadores de melanoma do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes.

4.3. Avaliação do perfil hematológico dos animais tratados

As análises hematológicas foram realizadas semanalmente. Após o período de tratamento, não ocorreram alterações significativas no número de leucócitos dos animais do grupo controle, cujo valor médio no 28º dia foi de $7,0 \pm 0,7 \times 10^6/\text{mL}$, (Figura 21). No grupo tratado apenas com RF houve uma redução significativa no número de leucócitos após a terceira semana de tratamento, cujo valor médio foi de $3,3 \pm 0,4 \times 10^6/\text{mL}$ (Figura 21). Os animais tratados com RF associado ao quimioterápico etoposídeo apresentaram um aumento significativo no número de leucócitos durante a primeira semana de tratamento; posteriormente, houve uma redução significativa, sendo o valor médio de $2,8 \pm 1,1 \times 10^6/\text{mL}$, ao final do tratamento (Figura 21). O tratamento apenas com o etoposídeo acarretou no aumento do número de leucócitos durante as

primeiras semanas de tratamento, entretanto, os animais morreram na terceira semana de tratamento, dessa maneira não foi possível observar as alterações no perfil hematológico até o final do período de tratamento (Figura 21).

Figura 21: O gráfico de barras demonstra a análise do número total de leucócitos, dos animais portadores de melanoma do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Quanto aos leucócitos dos animais do grupo controle, houve diminuição significativa no número de eritrócitos, com valor médio de $1,8 \pm 0,3 \times 10^9/\text{mL}$ no 28º dia. Os camundongos do grupo tratado apenas com RF tiveram redução significativa no número de eritrócitos, cujo valor médio foi de $1,5 \pm 0,7 \times 10^9/\text{mL}$, no final do tratamento. O tratamento apenas com etoposídeo, nas duas primeiras semanas, também ocasionou a redução do número de leucócitos. Diferente dos resultados obtidos nos outros grupos, os animais tratados com RF associado ao etoposídeo apresentaram um

aumento significativo na última semana do tratamento, obtendo valor médio de $6,0 \pm 0,7 \times 10^9/\text{mL}$ no dia 28º (Figura 22).

Figura 22: O gráfico de barras demonstra a análise do número total de leucócitos, dos animais portadores de melanoma do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O número de plaquetas não sofreu alteração significativa no grupo controle durante todo o período de experimentação. No grupo tratado apenas com RF houve uma redução significativa nas primeiras semanas e, posteriormente, ocorreu um aumento significativo no número de plaquetas na última semana, com valor médio de $3,0 \pm 1,4 \times 10^3/\text{mm}^3$ (28º dia). Os animais tratados apenas com etoposídeo apresentaram elevação significativa no número de plaquetas. Diferentemente, no grupo tratado com RF associada ao etoposídeo houve redução no número de plaquetas na última semana do tratamento, cujo valor médio foi de $1880 \pm 565 \times 10^3/\text{mm}^3$ no 28º dia (Figura 23).

Figura 23: O gráfico de barras demonstra a análise do número total de plaquetas, dos animais portadores de melanoma do grupo controle e dos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

4.4. Determinação das fases do ciclo celular

As células de melanoma foram obtidas das massas tumorais que foram coletadas ao término dos tratamentos e o percentual destas nas diferentes fases do ciclo celular foi quantificado por citometria de fluxo. Os dot plots e histogramas representativos estão demonstrados nas figuras 24 A e B. O grupo controle apresentou populações de células distribuídas em todas as fases do ciclo celular, com valores médios de $10,7 \pm 4,9\%$ (Sub-G₁); $60,2 \pm 4,1\%$ (G₀/G₁); $7,9 \pm 2,7\%$ (fase - S) e $21,1 \pm 1,1\%$ (G₂/M) (Figura 25 A e B). No grupo tratado apenas com RF não ocorreu alteração significativa na distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular, em comparação com o grupo controle.

As células dos camundongos tratados com RF associada ao etoposídeo apresentaram diminuição significativa na fase G₀/G₁, com valor de $32,2 \pm 2,5\%$. No tratamento com RF associada ao etoposídeo, a porcentagem de células na fase S

aumentou significativamente, apresentando percentual médio de $19,3 \pm 0,4\%$ (Figura 25 A e B).

O tratamento apenas com etoposídeo induziu o aumento significativo na porcentagem de células na fase Sub-G₁, em relação ao grupo controle, com valor médio de $39,2 \pm 6,4\%$ (Figura 25 A e B). A análise das células tumorais do grupo tratado com o etoposídeo foi realizada a partir da massa tumoral obtida de todos os animais que morreram na terceira semana de tratamento.

Figura 24: Análise da distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular das células tumorais de melanoma. (A) Gráficos do tipo Dot plots e (B) histogramas representativos das análises do ciclo celular, adquiridos por citometria de fluxo e analisados pelo programa WindMdi 2.9.

Figura 25: Avaliação dos efeitos no ciclo celular no grupo controle e nos animais tratados com RF, etoposídeo e RF associada ao etoposídeo. A: Fração subdiploide (sub-G₁). B: Distribuição das células nas fases do ciclo celular. Grau de significância estatística *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001.

4.5. Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Após o período de tratamento, as massas tumorais foram coletadas e os potenciais elétricos mitocondriais foram avaliados por citometria de fluxo, utilizando-se os fluorocromos rodamina 123 e JC-1.

No grupo controle os percentuais de células com mitocôndrias ativas e inativas foram de 85,6% e 14,4%, respectivamente. O grupo tratado apenas com RF apresentou um aumento significativo no número de células inativas, correspondendo a 33,0%; o

percentual de células ativas foi de 67,0%. O tratamento com RF associado ao etoposídeo demonstrou maior eficácia em induzir alteração no $\Psi\Delta m$, havendo uma elevação expressiva no número de células inativas da ordem de 65%; o percentual de células ativas foi de 35%. Os animais que foram tratados apenas com etoposídeo morreram durante a terceira semana; entretanto, 52% das células tumorais coletadas após a necropsia apresentaram mitocôndrias inviáveis e 48% viáveis (Figura 26).

Figura 26: Avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial. Histogramas representativos (A) e gráficos (B) demonstram a porcentagem de células com mitocôndrias ativas e inativas. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

4.6. Determinação do processo autofágico por citometria de fluxo.

O processo autofágico foi determinado a partir das suspensões celulares das massas tumorais coletadas após o término dos tratamentos utilizando-se o anticorpo LC-2. Os resultados demonstraram que os animais que receberam apenas o tratamento com RF não tiveram aumento significativo no processo autofágico. O mesmo resultado foi observado nos animais do grupo etoposídeo. Contudo, os animais do grupo de tratamento RF + etoposídeo tiveram aumento significativo no número de células autofágicas, sugerindo uma possível envolvimento da autofagia no processo de morte celular (Figura 27).

Figura 27: (A) Os histogramas representativos mostram a distribuição do número de células em relação à intensidade de fluorescência, demonstrando a porcentagem de células com o potencial elétrico mitocondrial ativo e inativo. (B) O gráfico de barras demonstra a porcentagem de células tumorais com o potencial elétrico mitocondrial ativo e inativo. Os valores são expressos em média $\pm$ DP desvio padrão de três experimentos independentes. Grau de significância estatística * $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$.

4.7. Alterações histopatológicas dos órgãos dos camundongos do grupo controle e tratamentos

As alterações histopatológicas dos órgãos dos camundongos portadores de melanoma foram avaliadas após o período de tratamento. Foi possível constatar que o tratamento apenas com o etoposídeo induziu alterações na arquitetura do parênquima renal e hepático, nos quais se observou grande área necrótica, presença de células atípicas (Figura 28 A-D) e dilatação sinusoidal no parênquima hepático. A massa tumoral apresentou conformação densa, com grande número de células neoplásicas e a presença de figuras em mitose atípica (Figura 29 E e F). O parênquima pulmonar apresentou focos de infiltrados inflamatório no espaço interalveolar, com presença de poucas células atípicas (Figura 29 G). No baço foi possível observar áreas em necrose e alteração da arquitetura, entretanto, não foi possível evidenciar de forma nítida a presença de células neoplásicas (Figura 29 H).

Os animais tratados apenas com a RF apresentaram alterações na arquitetura do parênquima do baço, com áreas de necrose e presença de células neoplásicas (Figura 30 A e B). Não ocorreram alterações significativas no parênquima renal e também não foi possível evidenciar a presença de células neoplásicas com nitidez (Figura 30 C). O parênquima do fígado apresentou alteração na sua arquitetura, sendo possível observar necrose em diferentes regiões, dilatação sinusoidal e presença de células neoplásicas em mitose (Figuras 30 D e 31 E). A análise microscópica da massa tumoral demonstrou que o tratamento apenas com RF foi capaz de induzir morte celular das células neoplásicas evidenciadas pela presença de áreas com necrose e corpos apoptóticos (Figura 31 F). No parênquima pulmonar foi possível observar congestão no espaço interalveolar e presença de células neoplásicas (Figura 31 G e H).

A associação da RF ao tratamento com o etoposídeo demonstrou maior eficácia em promover citotoxicidade nas células tumorais, sem acarretar a morte de todos os animais durante o período de tratamento, fato que ocorreu no tratamento com o etoposídeo isolado. No parênquima hepático foi possível evidenciar grande área de necrose, desorganização da arquitetura e grande número de corpos apoptóticos, sem presença nítida de células neoplásicas (Figura 32 A e B). O parênquima renal não apresentou alterações significativas na sua estrutura, havendo pequenos focos de necrose e presença de poucas células com aspecto atípico (Figura 32 C e D). A massa tumoral apresentou grande redução na densidade da população celular, com vasta área de necrose e presença de corpos apoptóticos (Figura 33 E e F). O parênquima do baço e pulmão não continham alterações na arquitetura, entretanto, é possível evidenciar raras células com aspecto atípico (Figura 33 G e H).

Figura 28: Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados com etoposídeo, aplicado na concentração de 1 mg/l. (A, B) Parênquima renal; (C, D) parênquima hepático. Coloração de H&E

Figura 291: Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados com etoposídeo, aplicado na concentração de 1 mg/l. (G) parênquima pulmonar; (H) parênquima do baço. Presença de células atípica (seta); áreas com focos de necrose (asterisco). Coloração de H&E.

Figura 30: Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados apenas com RF, utilizando-se tips fracionados 100 PIN, energia de 39,0 Joules, duração do pulso de 0,4s, nível II. (A, B) Parênquima do baço; (C) parênquima renal; (D, E) parênquima hepático. C:oloração de H&E.

Figura 31: Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados apenas com RF, utilizando-se tips fracionados 100 PIN, energia de 39,0 joules, duração do pulso de 0,4s, nível II. (G, H) parênquima pulmonar. Presença de células atípicas (seta); áreas com foco de necrose (asterisco). Coloração de H&E.

Figura 32: Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados com RF associada ao etoposídeo. (A, B) Parênquima hepático; presença de formação de corpos apoptóticos (seta). (C, D) parênquima renal. Coloração de H&E

Figura 33: Fotomicrografias do aspecto histológico dos órgãos e massa tumoral de camundongos C57BL/6J, portadores de melanoma, tratados com RF associada ao etoposídeo. (E, F) arquitetura da massa tumoral; é possível evidenciar a presença de corpos apoptóticos (seta). (G) parênquima do baço; (H) parênquima pulmonar; é possível observar a presença de células com aspecto atípico. Área com necrose (asterisco). Coloração de H&E.

5.DISSCUSSÃO

Sistemas de infusão transdérmica de fármacos têm sido utilizados há mais de 20 anos em seres humanos, mas apresentam limitações relacionadas aos tipos de moléculas ativas que podem ser entregues por esta via. Poucas drogas apresentam a capacidade de difundirem-se passivamente através do estrato córneo em taxas terapeuticamente significativas (Levin, 2008; Alkilani et al., 2015).

A ablação térmica por radiofrequência (RF) envolve a colocação de um eletrodo em forma de agulha fina (não invasiva) diretamente na superfície da pele, com posterior aplicação de corrente alternada de alta frequência (~100 kHz) o que produz microcanais na epiderme. Este efeito possibilita a entrega transdérmica de um grande número de drogas hidrófilas e macromoléculas com baixo custo (Levin, 2008; Alkilani et al., 2015).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os grupos de tratamento apresentaram evoluções clínicas diferentes, em todos os aspectos avaliados. Foi possível observar que os animais do grupo controle tiveram um aumento evidente da massa tumoral, com progressão para caquexia e perda de massa muscular. Dessa forma, a manutenção do peso destes animais durante o período experimental foi ocasionada pelo crescimento da massa tumoral, que substituiu partes do tecido muscular e adiposo. Este efeito é normalmente observado na evolução natural do melanoma murino B16F10 e de outros tumores. O último estágio clínico dos pacientes com câncer é caracterizado por caquexia e perda catastrófica e progressiva de massa muscular, principalmente do músculo esquelético (Rumyantsev, 2013).

Os dados demonstraram que o tratamento dos animais com radiofrequência seguido por etoposídeo, foi o mais eficiente em promover uma redução da taxa de crescimento tumoral, quando comparamos ao grupo controle e os outros tratamentos. Também foi possível verificar que a redução do peso médio desses animais foi

correlacionada com a redução da massa tumoral. Estes dados corroboram com o estudo publicado recentemente por nosso grupo, no qual demonstrou-se que os animais tratados com radiofrequência seguida do etoposídeo apresentaram menor volume tumoral ao final do tratamento (Salomão et al., 2016).

Recentes estudos têm demonstrado que a via transdérmica de administração de fármacos apresenta numerosas vantagens. Trata-se de uma alternativa não invasiva para as vias parentéricas e oral. Além disso, a grande área de superfície da pele bem como a facilidade de acesso propiciam muitas opções para a absorção transdérmica (Alkilani et al., 2015). A ablação por radiofrequência tem sido relatada para aumentar a entrega do hormônio de crescimento humano em ratos e cobaias com biodisponibilidades de 75 e 33%, respectivamente (Kalluri; Banga, 2011). Desta forma, a menor taxa de crescimento tumoral no grupo tratado com radiofrequência seguida pelo etoposídeo pode ser explicada pela maior disponibilidade do quimioterápico no interior da massa tumoral. Este fato ficou evidente quando realizou-se a comparação com os outros grupos de tratamento: No grupo RF notou-se uma maior taxa de aumento do volume tumoral com maior progressão da caquexia e perda de massa muscular. No grupo tratado apenas com etoposídeo houve aumento da massa tumoral, mas devido a toxicidade do quimioterápico (aplicado em toda região dorsal), os animais morreram na terceira semana de tratamento. Isso pode ser um indício de que a aplicação tópica além de necessitar de uma extensa área de aplicação para alcançar níveis terapêuticos, não direciona os fármacos especificamente para os locais os quais se deseja, não proporcionando desta forma maior disponibilidade no microambiente tumoral.

O etoposídeo é um derivado semissintético da podofilotoxina utilizado para o tratamento de carcinoma de pequenas células de pulmão, leucemia aguda monocítica e mioelocítica, doença de Hodgkin, Linfoma não-Hodgkin, tumores testiculares e tumores

testiculares refratários (Vesela et al., 2017). Apesar dos efeitos antitumorais, a administração do etoposídeo por via oral promove diversos efeitos adversos, dentre eles, mielossupressão e outras alterações hematológicas. As consequências clínicas da mielossupressão grave incluem infecções virais, bacterianas, fúngicas e/ou parasitárias, localizadas ou sistêmicas quando este fármaco é utilizado sozinho ou em combinação com outros agentes imunossupressores (Najar; Johri, 2014; Akhtar et al., 2016). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os animais tratados apenas com o etoposídeo apresentaram leucocitose e plaquetose, a partir da segunda semana de tratamento. Este fator pode ter contribuído para a morte dos animais deste grupo. Estudos tem evidenciado que a leucocitose e a plaquetocitose estão associadas a um risco aumentado de trombose arterial e venosa em diversas condições clínicas, incluindo doença cardíaca isquêmica, doenças cerebrovasculares, e distúrbios mieloproliferativos (Connolly et al., 2010).

A associação da radiofrequência ao tratamento tópico com etoposídeo foi eficaz em aumentar a disponibilidade do fármaco no interior das massas tumorais e com isso aumentar a sobrevida dos animais. Também notou-se diminuição da plaquetocitose pois ao final do tratamento, o número de plaquetas foi próximo ao valor referencial. Este tratamento também elevou o número de eritrócitos para valores próximos à normalidade, quando em comparação com os grupos controle tumoral e controle RF, nos quais ocorreu uma evolução para anemia no decorrer da progressão tumoral. Entretanto, observou-se uma leucopenia ao final do tratamento do grupo RF + Etoposídeo, que pode estar correlacionada aos efeitos colaterais do uso prolongado do quimioterápico.

Os efeitos celulares e moleculares do etoposídeo resultam da sua complexação com a enzima topoisomerase II (Deweese et al., 2009). Ao impedir que essa enzima religue as moléculas de ácido nucleico clivadas, o fármaco induz quebras nas fitas do

DNA, resultando na ativação das vias ATM (Ataxia telangiectasia mutated) e ATR (ATM-RAD3-related gene), envolvidas nos mecanismos de reparo do DNA (Wu et al., 2011; Gibson et al., 2016; Vesela et al., 2017). Ocorre então paralização do ciclo celular entre as fases S e G₂/M, havendo remodelação da cromatina e bloqueio da replicação do DNA, com subsequente indução da morte celular por apoptose, que é desencadeada principalmente devido à ativação da via intrínseca, mas também através da sinalização mediada pelo receptor de morte CD95 (Zhao et al., 2012; Vesela et al., 2017).

A análise das fases do ciclo celular evidenciou, no grupo controle tumoral, o perfil de multiplicação destas células, pois foi possível observar uma porcentagem significativa de células nas fase S e G₂/M. Como demonstrado, não houveram diferenças significativas no perfil do ciclo celular entre os grupos controle e RF. Os dados do ciclo celular corroboram com os resultados obtidos anteriormente, no qual o tratamento com radiofrequência e etoposídeo promoveu um melhor efeito terapêutico. Neste grupo de tratamento ocorreu um aumento no número de células nas fases S e G₂/M do ciclo celular, devido a maior disponibilidade do quimioterápico no microambiente tumoral. No grupo tratado apenas com etoposídeo foi possível observar que existiu um aumento no percentual da fase sub-G₁, entretanto, todos os animais morreram durante o tratamento, o que indica que a dose administrada passou dos níveis terapêuticos, ocasionando toxicidade. Desta forma, não foi possível visualizar o aumento clássico de células nas fases S e G₂/M que ocorre em função da complexação do etoposídeo com a topoisomerase. Este é outro indício de que neste grupo de tratamento, apesar dos devastadores efeitos sistêmicos do fármaco, este não apresentou concentrações significativas no microambiente tumoral.

A radiofrequência fracionada cria uma matriz de microcanais de pequeno porte na pele (Kam et al., 2012). Neste estudo foi observado a eficácia do tratamento com

radiofrequência juntamente com o etoposídeo no melanoma B16F10, com notável aumento de células nas fases S e G₂/M do ciclo celular, possivelmente devido a maior permeação cutânea do fármaco.

Kam et al. (2012) estudaram a recuperação dos microcanais criados pela tecnologia de ablação por RF. A entrega transdérmica significativa de fármacos foi demonstrada em até 24 horas após a aplicação do dispositivo, sugerindo que é possível atingir-se uma entrega prolongada de drogas solúveis em água, incluindo macromoléculas (Kam et al., 2012).

Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados recentemente sugeriram que o calor da radiofrequência pode melhorar a eficiência terapêutica da doxorrubicina em células tumorais de mama em humanos, e que a entrega de calor por radiofrequência intratumoral pode aumentar consideravelmente os resultados da quimioterapia local para o câncer de mama (Zhou et al., 2014). De forma semelhante aos resultados de redução do volume tumoral obtidos neste estudo, Weinberg e colaboradores demonstraram que, após a ablação a difusão de quimioterápicos no centro de tumor hepático foi aumentada em 75%, em relação ao não ablacionado (Weinberg et al., 2005).

A utilização da radiofrequência tem mostrado resultados com diversas moléculas. Como exemplo pode ser citado a RF microagulhada, que tem gerado melhorias ao tratamento do melasma através do uso combinado com a administração transdérmica de agentes despigmentantes. Esta pode ser uma ferramenta alternativa segura, tolerável e eficaz para o tratamento de melasma (Cameli et al., 2014). Nossos resultados demonstram que o tratamento com etoposídeo associado com a radiofrequência fracionada resulta em melhor resposta terapêutica dos animais portadores de melanoma,

pois a RF promove a abertura de canais no estrato córneo da pele, possivelmente, aumentando a disponibilidade do quimioterápico na massa tumoral.

A maior eficácia do tratamento utilizando a radiofrequência fracionada associada ao etoposídeo também foi confirmada pela análise do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\psi$). Os resultados demonstram que o grupo tratado com RF + etoposídeo apresentou aumento do número de células com mitocôndrias inativas. No grupo tratado apenas com o etoposídeo houve menor aumento no número de células inativas; mas, como relatado anteriormente, todos os animais vieram a óbito durante o tratamento. Estudos evidenciam que o etoposídeo possui a capacidade de induzir alterações no $\Delta\psi_m$, com a subsequente liberação de proteínas para o citosol (Vilches; Salido, 2005; Salido et al., 2007; Vilches; Salido, 2007).

A disfunção mitocondrial está relacionada com o desencadeamento do processo de morte celular programada, por meio da permeabilização da membrana mitocondrial externa para grandes moléculas, incluindo íons que são relevantes neste processo. A detecção do evento de transição de permeabilidade mitocondrial fornece uma indicação precoce do início da apoptose. Este processo é tipicamente definido como um colapso no gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial, avaliado pela alteração no potencial de membrana mitocondrial. A despolarização mitocondrial é um evento típico da morte celular apoptótica (Vilches; Salido, 2005; Salido et al., 2007; Vilches; Salido, 2007).

A análise histopatológica corroborou com todos os resultados descritos anteriormente, comprovando que o tratamento com quimioterápico associado a radiofrequência resulta na melhor resposta antitumoral. Apesar dos animais do grupo RF + etoposídeo apresentarem evolução para caquexia, foi possível notar que houve maior redução na massa tumoral, em comparação com todos os grupos. Este tratamento

foi eficaz em promover citotoxicidade nas células tumorais sem acarretar na morte dos animais durante o período de tratamento, o que está em concordância com dados recentemente publicados por nosso grupo (D'Agostino et al., 2014; Salomão et al., 2016).

A massa tumoral dos animais tratados com RF + etoposídeo apresentou significativa redução na densidade da população celular, com extensa área de necrose e presença de corpos apoptóticos, em comparação com todos os grupos. A análise histopatológica dos diversos órgãos mostrou a presença de metástases, porém, sem alterações estruturais na arquitetura histológica indicativas de toxicidade. Em contrapartida, nos animais tratados apenas com o etoposídeo foi possível observar alterações na arquitetura dos parênquimas renal, hepático, pulmonar e do baço.

O tratamento apenas com RF ocasionou a indução de morte celular das células neoplásicas, pois é possível evidenciar a presença de áreas em necrose e corpos apoptóticos na massa tumoral. Neste trabalho a avaliação dos aspectos histológicos evidenciou que, nos animais portadores de melanoma que foram tratados com RF + etoposídeo, houve maior eficácia na redução da massa tumoral em diferentes órgãos, sem a ocorrência de alterações significativas na arquitetura tecidual. O conjunto de resultados sugere que o tratamento com a radiofrequência + etoposídeo, quando comparado aos outros grupos de tratamento, resulta em melhor resposta antitumoral do quimioterápico, com redução da toxicidade.

6.CONCLUSÕES

(a) O tratamento apenas com etoposídeo reduziu a sobrevida dos animais e ocasionou alterações histológicas indicativas de toxicidade.

(b) A infusão transdérmica do etoposídeo por dispositivo de radiofrequência promoveu redução significativa do volume tumoral, em comparação com todos os grupos experimentais, sem ocasionar mortalidade. Este tratamento também diminui a plaquetocitose e elevou o número de eritrócitos, em comparação com os outros grupos.

(c) A análise histopatológica dos órgãos dos animais tratados com RF + etoposídeo evidenciou que não houve alterações significativas na arquitetura tecidual.

(d) O uso da radiofrequência isolada foi menos eficaz em reduzir o volume tumoral, em comparação com RF + etoposídeo.

(e) O grupo tratado com RF + etoposídeo foi o que apresentou maior percentual de células com mitocôndrias inativas e estacionadas na fase S/G₂M, atestando o aumento da eficácia demonstrada no estudo *in vivo*.

(f) O conjunto de resultados sugere que o tratamento com a radiofrequência + etoposídeo resulta em melhor resposta antitumoral do quimioterápico, com redução da toxicidade.

(g) A infusão transdérmica de fármacos constitui uma estratégia promissora para aumentar a eficácia local e sistêmica de fármacos, incluindo agentes antitumorais.

7. REFERÊNCIAS

Abbotts R, Jewell R, Nsengimana J, Maloney DJ, Simeonov A, Seedhouse C, Elliott F, Laye J, Walker C, Jadhav A, Grabowska A, Ball G, Patel PM, Newton-Bishop J, Wilson DM 3rd, Madhusudan S. Targeting human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) in phosphatase and tensin homolog (PTEN) deficient melanoma cells for personalized therapy. *Oncotarget*. 2014;5(10):3273-86.

Abdel-Malek ZA, Ruwe A, Kavanagh-Starner R, Kadekaro, AL, Swope V, Haskell-Luevano C, Koikov L, Knittel JJ. Alpha-MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes. *Pigment. Cell Melanoma Res*. 2009;22:635-44.

Agar NS, Halliday GM, Barnetson RS, Ananthaswamy HN, Wheeler M, Jones AM. The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2004;101:4954-59.

Aguissa-Toure AH, Li G. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(9):1475-91.

Akhtar N, Talegaonkar S, Khar RK, Jaggi MA. Validated stability-indicating LC method for estimation of etoposide in bulk and optimized self-nano emulsifying formulation: Kinetics and stability effects. *Saudi Pharm J*. 2013;21:103-11.

Akita H, Sasaki R, Yokoyama Y, Negishi K, Matsunaga K. The clinical experience and efficacy of bipolar radiofrequency with fractional photothermolysis for aged Asian skin. *Exp. Dermatol*. 2014;23(s1):37-42.

Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. *EJC Suppl*. 2013;11(2):81-91.

Alkilani AZ, Mccrudden MT, Donnelly RF. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*. 2015;22(4):438-70.

Anger M, Friedhofer F, Fukutaki MF, Ferreira MC, Landman G. Primary Cutaneous Melanoma: An 18-Year Study. *Clinics*. 2010;65(3):257-63.

Anna B, Blazej Z, Jacqueline G, Andrew CJ, Jeffrey R, Andrzej S. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Rev Dermatol*. 2007;2(4):451-69.

Antonescu CR, Busam KJ, Francone TD, Wong GC, Guo T, Agaram NP, Besmer P, Jungbluth A, Gimbel M, Chen CT, Veach D, Clarkson BD, Paty PB, Weiser MR. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int J Cancer*. 2007;121(2):257-64.

Ascierto PA, Agarwala S, Botti G, Cesano A, Ciliberto G, Davies MA, et al. Future perspectives in melanoma research: meeting report from the "Melanoma Bridge". *J Transl Med*. 2016;14:313-36.

- Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009a;27:6199-206.
- Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*. 2001;19:3622-34.
- Balch, CM. AJCC Cancer Staging Manual. ed 7th. New York: Springer Verlag; 2009b.
- Bandopadhyay M, Bulbule A, Butti R, Chakraborty G, Ghorpade P, Ghosh P et al. Osteopontin as a therapeutic target for cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(8):883-95.
- Barnhill RL, Katzen J, Spatz A, Fine J, Berwick M. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol*. 2005; 32:268.
- Bartek J, Lukas J. DNA damage checkpoint: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19:238-45.
- Beasley KL, Weiss RA. Radiofrequency in cosmetic dermatology. *Dermatol Clin*. 2014;32(1):79-90.
- Becker MR, Siegelin MD, Rompel R, Enk AH, Gaiser T. COX-2 expression in malignant melanoma: a novel prognostic marker? *Melanoma Res*. 2009;19(1):8-16.
- Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B, et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(12):894-903.
- Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci*. 2010;123:3209-214.
- Brenner M, Degitz K, Besch R, Berking C. Differential expression of melanoma-associated growth factors in keratinocytes and fibroblasts by ultraviolet A and ultraviolet B radiation. *Br J Dermatol*. 2005;153(4):733-9.
- Bresnick AR, Weber DJ, Jimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1): 96-109.
- Bronaugh RL, Maibach HI. *Percutaneous Absorption*. 4th ed. New York: Marcel Dekker; 2005.
- Burke KE. Photoaging: The role of oxidative stress. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010; 145:445-59.
- Callahan MK, Wolchok JD. At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*. 2013;94:41-53.
- Cameli N, Abril E, Mariano M, Berardesca E. Combined use of monopolar radiofrequency and transdermal drug delivery in the treatment of melasma. *Dermatol Surg*. 2014;40(7):748-55.

- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364:2507-16.
- Chen ST, Geller AC, Tsao H. Update on the epidemiology of melanoma. *Curr Dermatol Rep*. 2013;2(1):24-34.
- Chinchole P, Savale S, Wadile K. A novel approach on transdermal drug delivery system [TDDS]. *World J Pharm Sci*, 2016; 5(4): 932-958.
- Choi YD, Chun SM, Jin SA, Lee JB, Yun SJ. Amelanotic acral melanomas: clinicopathological, BRAF mutation, and KIT aberration analyses. *J Am Acad Dermatol*. 2013;69(5):700-7.
- Chua AW, Khoo YC, Tan BK, Tan KC, Foo CL, Chong SJ. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. *Burns Trauma*. 2016;19(4):1-14.
- Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest*. 2005;115(4):813-24.
- Coelho SG, Choi W, Brenner M, Miyamura Y, Yamaguchi Y, Wolber R, et al. Short- and long-term effects of UV radiation on the pigmentation of human skin. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2009;14:32-35.
- Connolly GC, Khorana AA, Kuderer NM, Culakova E, Francis CW, Lyman GH. Leukocytosis, thrombosis and early mortality in cancer patients initiating chemotherapy. *Thromb Res*. 2010;126(2):112-8.
- Courdavault S, Baudouin C, Charveron M, Canguilhem B, Favier A, Cadet J, Douki T. Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations. *DNA Repair (Amst)*. 2005;4(7):836-44.
- Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*. 2007;128(5):853-64.
- D'Agostino LG, Salomão Junior A, Viana DC, Luna ACL, Maria DA. The histological analysis by transdermal drug delivery on melanoma therapy. In: *Méndez-Vilas A (ed), Microscopy: advances in scientific research and education (6th edn)*. Formatex, Badajoz, 2014:348-55.
- Dendle J, Wu DC, Fabi SG, Melo D, Goldman MP. A Retrospective Evaluation of Subsurface Monopolar Radiofrequency for Lifting of the Face, Neck, and Jawline. *Dermatol Surg*. 2016;42(11):1261-5.
- Deweese JE, Osheroff N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: Wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:738-48.
- Dhote V, Bhatnagar P, Mishra PK, Mahajan SC, Mishra DK. Iontophoresis: A Potential Emergence of a Transdermal Drug Delivery System. *Sci Pharm*. 2012;80(1):1-28.

- Dickson PV, Gershenwald JE. Staging and Prognosis of Cutaneous Melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2011;20(1):1-17.
- Divaris M, Blugerman G, Paul MD. Face expressive lifting (FEL): an original surgical concept combined with bipolar radiofrequency. *Eur J Plast Surg*. 2014;37(2):69-76.
- D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):12222-48.
- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. *Biochemistry*. 2003;42(30):9221-6.
- Durand C, Alhammad A, Willett KC. Practical considerations for optimal transdermal drug delivery. *Am J Health Syst Pharm*. 2012;69:116-24.
- Elder DE, Gimotty PA, Guerry D. Cutaneous melanoma: estimating survival and recurrence risk based on histopathologic features. *Dermatol Ther*. 2005;18:369-85.
- Errico A, Costanzo V. Mechanisms of replication fork protection: a safeguard for genome stability. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2012;47:222-35.
- Ethun CG, Delman KA. The importance of surgical margins in melanoma. *J Surg Oncol*. 2016;113(3):339-45.
- Fang CL, Aljuffali IA, Li YC, Fang JY. Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. *Ther Deliv*. 2014;5(9):991-1006.
- Fedorenko IV, Gibney GT, Smalley KS. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*. 2013;32(25):3009-18.
- Fava P, Astrua C, Sanlorenzo M, Ribero S, Brizio M, Filippi AR, et al. Treatment of metastatic melanoma: a multidisciplinary approach. *G Ital Dermatol Venereol*. 2017;(3):241-261.
- Finn L, Markovic SN, Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Medicine*. 2012;10(23):1-10.
- Gaggioli C, Sahai E. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res*. 2007 20(3):161-72.
- Ghaffarian R, Muro S. Models and methods to evaluate transport of drug delivery systems across cellular barriers. *J Vis Exp*. 2013; 80(e50638):1-12.
- Gherardini L, Ciuti G, Tognarelli S, Cinti C. Searching for the Perfect Wave: The Effect of Radiofrequency Electromagnetic Fields on Cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15:5366-87.
- Gibson EG, King MM, Mercer SL, Deweese JE. Two-Mechanism Model for the Interaction of Etoposide Quinone with Topoisomerase IIa. *Chem Res Toxicol*. 2016;29(9):1541-8.

- Gold MH, Goldman MP, Rao J, Carcamo AS, Ehrlich M. Treatment of wrinkles and elastosis using vacuum-assisted bipolar radiofrequency heating of the dermis. *Dermatol Surg.* 2007;33(3):300-9.
- Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet.* 2007;44(2):99-106.
- Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7:a006080
- Grice JE, Ciotti S, Weiner N, Lockwood P, Cross SE, Roberts MS. Relative uptake of minoxidil into appendages and stratum corneum and permeation through human skin in vitro. *J. Pharm. Sci.* 2010;99(2):712-18
- Guy RH, Hadgraft J. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol.* 2009;26:1261-68.
- Harper JV, Brooks G. The mammalian cell cycle: an overview. *Methods Mol Biol.* 2005;296:113-53.
- Hodgkinson DJ. Clinical applications of radiofrequency: nonsurgical skin tightening (thermage). *Clinics in plastic surgery*, 2009;36(2):261-8.
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012;150(2):251-63.
- Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Eng J Med.* 2009;361:1475-85.
- Hsan KM, Chen CC, Shyur LF. Current Research and Development of Chemotherapeutic Agents for Melanoma. *Cancers*, 2010;2(2)397-419.
- Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res.* 2011;52:115-25.
- Instituto Nacional do Câncer. *Estimativas 2017: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2017.
- Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009;461:1071-8.
- Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, Rohlf ML, Richard J, Gershenwald JE, Kim KB, Lazar AJ, Hwu P, Davies MA. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer.* 2012;118(16):4014-23.
- Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene.* 2003;22(20):3099-112.
- Jones DS, Moss GP. Themed issue: recent advances in transdermal drug delivery. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62:669-70.
- Kalal BS, Upadhy D, Pai VR. Chemotherapy Resistance Mechanisms in Advanced Skin Cancer. *Oncol Rev.* 2017;11(326):19-25.

- Kalia YN, Naik A, Garrison J, Guy RH. Iontophoretic drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(5):619-58.
- Kalluri H, Banga AK. Transdermal delivery of proteins. *AAPS PharmSciTechN.* 2011;12(1):431-41.
- Kam Y, Sacks H, Kaplan KM, Stern M, Levin G. Radio Frequency-Microchannels for Transdermal Delivery: Characterization of Skin Recovery and Delivery. *Pharmacol Pharm.* 2012;3:20-8.
- Karagiannis P, Fittall M, Karagiannis SN. Evaluating biomarkers in melanoma. *Front Oncol.* 2014;4:383.
- Karande P, Jain A, Ergun K, Kispersky V, Mitragotri S. Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:4688-93.
- Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature.* 2004;432:316–23.
- Kelleher FC, McArthur GA. Targeting NRAS in melanoma, *Cancer J.* 2012;18(2):132-36.
- Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol.* 2016;37(7):8471-86.
- U, Vogt A. Follicular transport route - research progress and future perspectives. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(2):173-80.
- Krogh M, Christensen I, Bouwhuis M, Johansen JS, Nørgaard P, Schmidt H, Hansson J, Suci S, Eggermont AM, Bastholt L; Nordic Melanoma Group and EORTC Melanoma Group. *Melanoma Res.* 2016;26(4):367-76.
- Krueger N, Sadick NS. New-generation radiofrequency technology. *Cutis,* 2013;91(1):39-46.
- Kumar A, Chen F, Mozhi A, Zhang X, Zhao Y, Xue X et al. Innovative pharmaceutical development based on unique properties of nanoscale delivery formulation. *Nanoscale,* 2013;5(18):8307-25.
- Kutlubay Z, Engin B, Serdaroğlu S, Tüzün Y. Current Management of Malignant. Melanoma: State of the Art. In: Vereecken P, editor. *Highlights in Skin Cancer Melanoma.* Croácia: InTech; 2013.
- Landi MT, Baccarelli A, Tarone RE, Pesatori A, Tucker MA, Hedayati M et al. DNA repair, dysplastic nevi, and sunlight sensitivity in the development of cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94(2):94-101.
- Lee MI, Tomsu K, Von Eschen KB. Duration of survival for disseminated malignant melanoma: results of a meta-analysis. *Melanoma Res,* 2000;83:81-92.
- Leibeling D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol.* 2006; 37:225-38

- Levin G. Advances in Radio-Frequency Transdermal Drug Delivery. *Pharm Technol Drug Deliv.* 2008;(Supl)12-19.
- Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: Master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med.* 2006;12:406-14.
- Locatelli C, Filippin-Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB. Current Therapies and New Pharmacologic Targets for Metastatic Melanoma. In: Vereecken P editor. *Highlights in Skin Cancer Melanoma.* Croácia: InTech; 2013.
- Lombardi D, Lasagni L. Cell Biology - New Insights. In: Cell-cycle Alterations in Post-mitotic Cells and Cell Death by Mitotic Catastrophe. Serbia: InTech; 2010.
- Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long GV. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017. Apr 4 [Epub ahead of print]
- Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol.* 2013;31:290-97.
- Luo C, Shen J. Research progress in advanced melanoma. *Cancer Lett.* 2017;397:120-26.
- Luther N, Darvin ME, Sterry W, Lademann J, Patzelt A. Ethnic differences in skin physiology, hair follicle morphology and follicular penetration. *Skin Pharmacol Physiol.* 2012;25(4):182-91.
- Lyle M, Long GV. Diagnosis and treatment of KIT-mutant metastatic melanoma, *J Clin Oncol.* 2013;31(26):3176-81.
- Machet L, Boucaud A. Phonophoresis: efficiency, mechanisms and skin tolerance. *Int J Pharm.* 2002;243:1-15.
- Malumbres M1, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(3):153-66.
- Manola J, Atkins M, Ibrahim J, Kirkwood JM. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *J Clin Oncol.* 2000;18:3782-93.
- Marwah H, Garg T, Goyal AK, Rath G. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. *Drug Deliv.* 2016;23(2):564-78
- Meidan VM, Bonner MC, Michniak BB. Transfollicular drug delivery - is it a reality? *Int. J. Pharm.* 2005;306(1):1-14.
- Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Thompson JF, Kefford RF, Scolyer RA, Long GV. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(12):3242-9

- Mervic L. Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous melanoma. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2012a;21(2):27-31.
- Mervic L. Time course and pattern of metastasis of cutaneous melanoma differ between men and women. *PLoS One.* 2012b;7(3):e32955.
- Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006;355(1):51-65.
- Millet A, Martin AR, Ronco C, Rocchi S, Benhida R. Metastatic Melanoma: Insights Into the Evolution of the Treatments and Future Challenges. *Med Res Rev.* 2017;37(1):98-148.
- Najar IA, Johri RK. Pharmaceutical and pharmacological approaches for bioavailability enhancement of etoposide. *J Biosci.* 2014;39(1):139-44.
- Nordlund J.J. The melanocyte and the epidermal melanin unit: An expanded concept. *Dermatol Clin.* 2007;25:271–281.
- Nouspikel T. DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: Variations on versatility. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:994-1009.
- Oba J, Nakahara T, Abe T, Hagihara A, Moroi Y, Furue M. Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma: an immunohistochemical study and analysis of prognostic value. *J Dermatol Sci.* 2011;62(2):116-23.
- Otberg N, Richter H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J. Variations of hair follicle size and distributions in different body sites. *J Invest Dermatol.* 2004;122:14119.
- Palmisano A, Zámboreszky J, Oguz C, Csikász-Nagy A. Molecular Network Dynamics of Cell Cycle Control: Periodicity of Start and Finish. *Methods Mol Biol.* 2017;1524:331-49.
- Park CW, Son DD, Kim JY, Oh TO, Ha JM, Rhee YS, Park ES. Investigation of formulation factors affecting in vitro and in vivo characteristics of a galantamine transdermal system. *Int J Pharm.* 2012;436(1-2):32-40.
- Parnami N, Garg T, Rath G, Goyal AK. Development and characterization of nanocarriers for topical treatment of psoriasis by using combination therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2014;42(6):406-12
- Parsons MJ, Green DR. Mitochondria in cell death. *Essays Biochem.* 2010;47:99-114.
- Patzelt A, Lademann J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(6):787-97.
- Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques.* 2011;50(2):98-115.
- Pikal, MJ. The role of electroosmotic flow in transdermal iontophoresis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001;46(1):281-305.

- Plati J1, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)*. 2011;3(4):279-96.
- Polefka TG, Meyer TA, Agin PP, Bianchini RJ. Effects of solar radiation on the skin. *J Cosmet. Dermatol*. 2012;11:134-43.
- Pradelli LA, Bénateau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(10):1589-97.
- Prausnitz M R, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol*. 2008;26(11):1261-8.
- Prausnitz MR, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3:115-24.
- Pudukadan D1. Treatment of Acne Scars on Darker Skin Types Using a Noninsulated Smooth Motion, Electronically Controlled Radiofrequency Microneedles Treatment System. *Dermatol Surg*. 2017 Jan;43 Suppl 1:S64-S69.
- Rajabi P, Neshat A, Mokhtari M, Rajabi MA, Eftekhari M, Tavakoli P. The role of VEGF in melanoma progression. *J Res Med Sci*. 2012; 17(6):534-9.
- Rastrelli M, Tropea S, Pigozzo J, Bezzon E, Campana LG, Stramare R, Alaibac M, Rossi CR. Melanoma m1: diagnosis and therapy. *In vivo*. 2014; 28(3):273-85.
- Rehman K, Zulfakar MH. Recent advances in gel technologies for topical and transdermal drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2014;40:433-40.
- Rumyantsev SN. Evolutionary adaptations of human cancer for parasitic life. *Open J Immunol*. 2013;3(2):54-61.
- Saito RF, Tortelli TC Jr, Jacomassi MD, Otake AH, Chammas R. Emerging targets for combination therapy in melanomas. *FEBS Lett*. 2015;589(22):3438-48.
- Salido M, Gonzalez JL, Vilches J. Loss of mitochondrial membrane potential is inhibited by bombesin in etoposide-induced apoptosis in PC-3 prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(4):1292-9.
- Salomão JA, D'Agostino LG, Luna ACL, Menezes FC, Viana DC, Rodrigues CJ, Maria DA. Evaluation of Tumor Growth in Treatment of Murine Melanoma by Transdermal Infusion of Etoposide by Radiofrequency. *J Clin Exp Dermatol Res*. 2015;07(1):1000325.
- Sander CS, Chang H, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol*. 2004;43:326-335.
- Santos IDAO. Melanoma cutâneo. In: Forones NM. Guia de oncologia (guias de medicina ambulatorial e hospitalar. São Paulo: Manole; 2005. p.191-205.
- Sase SP, Ganu JV, Nagane N. Osteopontin: A Novel Protein Molecule. *Ind Med Gaz*. 2012;1(1):62-66.

Schaefer H, Lademann J. The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2001; 14(Suppl. 1):23-27.

Schoellhammer CM, Blankschtein D, Langer R. Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11:393-407.

Sharma N, Agarwal G, Rana A, Zulfiqar AB, Dinesh KD. A review: transdermal drug delivery system: a tool for novel drug delivery system. *Int J Drug Dev & Res*. 2011;3(3):70-84

Si L, Kong Y, Xu X, Flaherty KT, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Mao L, Guo J. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. *Eur J Cancer*. 2012;48(1):94-100.

Singh K, Arora N, Garg T. RFID: a trustable security tool in pharmaceutical industry. *Am J Pharm Tech Res*. 2012;2:113-27.

Singh S, Zafar A, Khan S, Naseem I. Towards therapeutic advances in melanoma management: An overview. *Life Sci*. 2017;174:50-58.

Sintov AC, Krymberk I, Daniel D, Hannan T, Sohn Z, Levin G. Radiofrequency microchanneling as a new way for electrically assisted transdermal delivery of hydrophilic drugs. *J Control Release*. 2003;89:311-20.

Sirsi SR, Borden MA. State-of-the-art materials for ultrasound-triggered drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;72:3-14.

Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, Hamzavi I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: A review. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12:54-64.

Skobowiat C, Dowdy JC, Sayre RM, Tuckey RC, Slominski A. Cutaneous hypothalamic-pituitary-adrenal axis homolog: Regulation by ultraviolet radiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;301(3):E484-93.

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2004;84:1155-228.

Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. Sensing the environment: Regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2012;212(115):1-98.

Solassol J, Du-Thanh A, Maudelonde T, Guillot B. Serum proteomic profiling reveals potential biomarkers for cutaneous malignant melanoma. *Int. J. Biol. Markers*. 2011; 26(2):82-7.

Spatz A, Cook MG, Elder DE, Piepkorn M, Ruiter DJ, Barnhill RL. Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas. *Eur J Cancer*. 2003;39:1861-5.

Sturm, R.A. Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link. *Melanoma Res.* 2002;12:405-16.

Subedi RK, Oh SY, Chun MK, Choi HK. Recent advances in transdermal drug delivery. *Arch Pharm Res.* 2010;33:339-51.

Swain S, Beg S, Singh A, Patro CHN, Rao ME. Advanced techniques for penetration enhancement in transdermal drug delivery system. *Curr Drug Deliv.* 2011;8(4):456-73.

Tas F. Metastatic Behavior in Melanoma: Timing, Pattern, Survival, and Influencing Factors. *J Oncol.* 2012; ID 647684: 1-9.

Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol.* 2011;29:2199-205.

Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. *J Cell Physiol.* 2010;222(1):38-41.

Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, Pilkington GJ. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. *Brain Pathol.* 2016;26(1):3-17.

Vesela E, Chroma K, Turi Z, Mistrik M. Common Chemical Inductors of Replication Stress: Focus on Cell-Based Studies. *Biomolecules.* 2017;7(19):1-36.

Vilches J, Salido M. Mitochondria and cell death. *Histol Histopathol.* 2005;1(Supl):S58-9.

Vilches J, Salido M. Neuropeptides as modulators of apoptosis in prostate cancer. In: Figgins HC, editor. Trends in cell apoptosis research. New York: Nova Publishers; 2007.

Visconti R, Della Monica R, Grieco D. Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):153.

Vogt A, Mandt N, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Follicular targeting - a promising tool in selective dermatotherapy. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2005;10:252-55.

Weinberg BD, Patel RB, Exner AA, Saidel GM, Gao J. Modeling doxorubicin transport to improve intratumoral drug delivery to RF ablated tumors. *J. Control. Release.* 2007;124(1-2):11-9.

Williams AC. Transdermal and Topical Drug Delivery from Theory to Clinical Practice. 1st ed. London: Pharmaceutical Press, 2003.

Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. *Exp Oncol.* 2012;34(3):255-62.

- Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Flow cytometry-based apoptosis detection. *Methods Mol Biol.* 2009;559:19-32.
- Wlodkowic D, Telford W, Skommer J, Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.* 2011;103:55-98.
- Wong SS, Ainger SA, Leonard JH, Sturm RA. MC1R variant allele effects on UVR-induced phosphorylation of p38, p53, and DDB2 repair protein responses in melanocytic cells in culture. *J. Invest. Dermatol.* 2012;132:1452-61.
- World Health Organization - OMS. *Skin Cancers* [Internet]. 2015 Set 10 [citado set 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>.
- Wu CC, Li TK, Farh L, Lin LY, Lin TS, Yu YJ, Yen TJ, Chiang CW, Chan NL. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science.* 2011;333:459-62.
- Wysocki AB. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am.* 1999;34(4):777-97.
- Yoshida K, Miki Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 2010;101(4):831-35.
- Zaleski-Larsen LA, Fabi SG. Laser-Assisted Drug Delivery. *Dermatol Surg.* 2016;42(8):919-31.
- Zebary A, Omholt K, Vassilaki I, Höiom V, Lindén D, Viberg L, Kanter-Lewensohn L, Johansson CH, Hansson J. KIT, NRAS, BRAF and PTEN mutations in a sample of Swedish patients with acral lentiginous melanoma. *J Dermatol Sci.* 2013;72(3):284-9.
- Zhao H, Rybak P, Dobrucki J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. Relationship of DNA damage signaling to DNA replication following treatment with DNA topoisomerase inhibitors camptothecin/topotecan, mitoxantrone, or etoposide. *Cytometry A.* 2012;81:45-51.
- Zhou Y, Han G, Wang Y, Hu X, Li Z, Chen L et al. Radiofrequency Heat-Enhanced Chemotherapy for Breast Cancer: Towards Interventional Molecular Image-Guided Chemotherapy. *Theranostics.* 2014;4(11):1145-53.

ANEXO I

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Tratamento de Melanoma Murino B16F10 com a infusão transdérmica de quimioterápicos: Etoposide e Dacarbazida", **protocolo nº 927/12**, sob a responsabilidade de Durvanei Augusto Maria e Abdo Salomão Júnior - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/10/2012.

We certify that the research entitled "Melanoma Murino B16F10 treatment with transdermal infusion of chemotherapy: Etoposide and Dacarbazine", **protocol number 927/12**, under the responsibility of Durvanei Augusto Maria and Abdo Salomão Júnior - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research - is in agreement with Brazilian laws for use of experimental animals and the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 10/10/2012.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
06/2012 - 01/2015	
Laboratório de Bioquímica e Biofísica	90 camundongos C57BL/6J (F)

São Paulo, 11 de outubro de 2012

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

ANEXO II

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado **“Tratamento de Melanoma Murino B16F10 com a infusão transdérmica de quimioterápicos: Etoposide e Dacarbazida”**, protocolo nº 152/15 sob a responsabilidade de **Juliana Pereira** e **Abdo Salomão Júnior**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado “Ad Referendum” pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em de 22.10.2015.

Vigência do Projeto	Janeiro/2015
Espécie/linhagem	Material Estocado
Nº de animais	Não se aplica

CEUA-FMUSP, 22 de Outubro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais