UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Prospecção de novos fármacos para melanoma em equivalente dérmico

Manoela Tiago dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria Engler

São Paulo
2011

Manoela Tiago dos Santos

Prospecção de novos fármacos para melanoma em equivalente dérmico

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria Engler
Orientadora/Presidente

_____
1º. Examinador

_____
2º. Examinador

São Paulo, _____ de 2011.

Ao meu amado Roque, por me lembrar
que o futuro é feito a partir da
constante dedicação no presente.

À minha mãe, por sempre acreditar e

nunca me deixar desistir.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu Maior Mestre, que possibilitou que tudo acontecesse. Muito obrigada Senhor Jesus por me instruir e por colocar em minha vida pessoas preciosas que me auxiliaram a percorrer este caminho.

Ao meu marido Roque, por todo amor, incentivo, confiança e companheirismo incondicionais. Te amo muito!!!

Aos meus pais, pelo amor, auxílio, compreensão e exemplos de perseverança. Mãe, te amo muito, você é o meu ânimo de todos os dias!! Pai, muito obrigada por me ensinar a não me preocupar à toa e a respirar fundo e continuar. Agradeço à minhas irmãs Luciana e Fabiana, por se orgulharem de mim. Nini, Ingrid e Melissa, amo muito vocês.

À Profa. Silvya Stuchi, minha orientadora. Muito obrigada pela competência, respeito, confiança, incentivo e palavras de consolo. Agradeço muito por acreditar em mim, mesmo nos momentos em que eu duvidei.

À Profa. Silvia Berlanga por toda sabedoria e conselhos. É um prazer trabalhar ao seu lado.

Aos meus companheiros de laboratório Camila, Raquel, Carla, Rebeca, Mari F. Moura, Rafael, Diogo, Renato, Érika, Tati, Laura, Andréa, Bianca, Gláucia e Fernanda, muito obrigada a todos pelos momentos de descontração, discussões filosóficas e auxílio nas interpretações dos resultados. Agradeço especialmente à Carla, pela prontidão para esclarecimento de dúvidas; ao Rafael, por alguns ensaios prévios; e ao Renato, responsável pela infecção das linhagens de melanoma com vetor contendo GFP, que possibilitou a realização dos ensaios de citometria de fluxo.

À Renatinha, pelo auxílio nos ensaios de citometria de fluxo.

Ao Laboratório de Bioquímica, especialmente à Profa. Ana Campa, ao Edson e à Silvana, por me auxiliarem nos ensaios de ELISA e pela extrema prontidão.

Aos meus amigos, especialmente Ana Beatriz, Felipe, Daniela, Fabiana Meliso, Alessandra, Nicole e Patricia Salgado, que mesmo seguindo caminhos diversos, sempre se fizeram presentes com lembranças, palavras de encorajamento e amor. Agradeço aos meus irmãos da Igreja da Vila das

Belezas, por ouvirem meus prantos e me alegrarem nos momentos difíceis, mesmo sem saber.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, pela prontidão e simpatia dos funcionários.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo auxílio financeiro e espaço físico.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP (Processo n°. 08/58817-4) pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os modelos de reconstrução do microambiente são úteis para investigar as propriedades biológicas dos melanócitos humanos com a matriz e como plataforma para testes de novos fármacos. Existe uma demanda crescente para a utilização de pele e derme reconstruídas em laboratório, em ensaios *in vitro* de citotoxicidade, viabilidade celular, crescimento celular, irritabilidade e avaliação dos constituintes da matriz extracelular. Caracterizamos, em equivalente dérmico, alguns mecanismos de viabilidade e invasão de melanoma metastático humano quando na presença da matriz, a fim de ampliar o conhecimento a respeito de novas terapias contra o melanoma e entender os mecanismos que favorecem seu potencial invasivo, mimetizando com mais fidelidade o que ocorre *in vivo*. Através da validação deste modelo, constatamos que ele é essencial para resgatar a fisiopatologia do tumor, pois o melanoma, na presença de equivalente dérmico, torna-se capaz de evadir mecanismos de morte e aumentar a secreção de metaproteinases e citocinas que favorecerão a evolução tumoral. Avaliamos também as propriedades antineoplásicas do ácido clorogênico, que já foram relatadas em um grande número de tumores, porém os mecanismos que levam à sua ação antitumoral ainda não foram bem elucidados. Diante dos trabalhos enfatizando o efeito quimioprotetor dos polifenóis, referentes à sua ação antioxidante em células neoplásicas e com potencial metastático, não há na literatura estudos que comprovem a eficácia do ácido clorogênico sobre células de melanoma metastático humano. Portanto, este estudo visou recriar a estrutura dérmica *in vitro* e, a partir disso, comparar a resposta de fármacos em células de melanoma cultivada em equivalente dérmico, a fim de avaliar se há modulação diferencial nesse substrato, sugerindo, portanto, um protocolo mais eficaz para a prospecção de fármacos antimelanoma.

Palavras-chaves: cultura de células; melanoma; equivalente dérmico; citotoxicidade.

ABSTRACT

The microenvironment reconstruction models are useful for investigating the biological properties of human melanocytes onto the matrix and as platform for testing new drugs. There is a growing demand for the use of reconstructed skin and dermis in the laboratory for *in vitro* assays of cytotoxicity, viability, cell growth, irritability, and evaluation of the extracellular matrix. We characterize in dermal equivalent some mechanisms for cell viability and invasion of human metastatic melanoma in the presence of matrix, the order to increase knowledge about new therapies against melanoma and to understand the mechanisms that favor its invasive potential, to more closely mimic what occurs *in vivo*. By means of this model, we find that it is essential to rescue the tumor physiopathology as melanoma, in the presence of dermal equivalent, it is able to evade death mechanisms and increase the expression of metalloproteinases and cytokines which favor the tumor evolution. We also evaluated the antineoplastic properties of chlorogenic acid, that have been reported in a large number of tumors, but the mechanisms that lead to its antitumor action has not been well elucidated. Before the work emphasizing the chemoprotective effect of polyphenols related to its antioxidant action in neoplastic cells and with metastatic potential, there is no literature studies confirming the effectiveness of chlorogenic acid on human metastatic melanoma cells. Therefore, this study aims to rebuild the dermal structure *in vitro*, and from this, to compare the response to drugs in melanoma cells dermal equivalent cultured in order to evaluate whether modulation differential on the substrate, thus suggesting a protocol more effective for prospecting antimelanoma drugs.

Keywords: cell culture; melanoma; dermal equivalent; cytotoxicity.

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA 3
A pele humana 3
O melanoma cutâneo humano 6
CAPÍTULO I: RECRIANDO *IN VITRO* O PROCESSO INVASOR DO MELANOMA EM EQUIVALENTE DÉRMICO 12
1. INTRODUÇÃO 12
1.1. Pele e modelos experimentais 12
1.2. Intercalantes de DNA 13
1.3. Doxorrubicina: eficácia e toxicidade 14
2. OBJETIVO 16
3. MATERIAL E MÉTODOS 16
3.1. Linhagens celulares 16
3.2. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares 17
3.3. Geração de equivalentes dérmicos normais e com melanomas (adaptado de Maria e Wada, 1996, e Boccardo et al., 2004) 18
3.4. Preparo do substrato e geração de colágeno tipo I com melanomas 18
3.5. Tratamento das células 19
3.6. Condições experimentais 19
3.7. Digestão da matriz colagênica e coleta das células 21
3.9. Caracterização de morte celular 22
3.10. Análise de expressão proteica através de ensaios de Western Blot 24
3.11. Zimografia de gelatinases 25
3.12. Avaliação da atividade gelatinolítica 26
3.13. Quantificação de MMP-2 ativa, pelo ensaio de *Biotrak* 26
3.14. Quantificação de IL-6 e IL-8, por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay)* 27
3.15. Análise estatística 27
4. RESULTADOS 28
4.1. Viabilidade celular e citotoxicidade 28
4.2. Indução de mecanismos de morte celular 34
4.3. Inibição de metaproteinases 35
4.4. Modulação de interleucinas pró-tumorais 38
4.5. Invasão em ambiente biomimético 43
5. DISCUSSÃO 46

5.1. Viabilidade celular e Citotoxicidade 46
4.2. Indução de mecanismos de morte celular 47
4.3. Inibição de metaproteinases 49
4.4. Modulação de interleucinas pró-tumorais 50
4.5. Invasão em ambiente biomimético 52
6. CONCLUSÃO 53
CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE LINHAGENS DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO 54
1. INTRODUÇÃO 54
1.1. Antioxidantes e câncer 54
1.2. Polifenóis e sua ação antitumoral 55
1.3. Ácido clorogênico 56
2. OBJETIVO 58
3. MATERIAL E MÉTODOS 59
3.1. Linhagens celulares 59
3.2. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares 60
3.3. Tratamento das culturas 60
3.4. Viabilidade e crescimento celular 60
3.5. Invasão celular 61
3.6. Migração celular 62
3.7. Avaliação de parada de ciclo celular 62
3.8. Análise de expressão proteica através de ensaios de Western Blot 63
3.9. Análise estatística 64
4. RESULTADOS 64
4.1. Viabilidade celular 64
DISCUSSÃO 77
CONCLUSÃO 78
BIBLIOGRAFIA 79

REVISÃO DA LITERATURA

A pele humana

A pele, o maior órgão do corpo humano, está organizada histologicamente em epiderme e derme. Ela ainda abriga um tecido adiposo subcutâneo, denominado hipoderme (KANITAKIS, 2002).

A camada mais externa, conhecida como a epiderme, funciona como uma fronteira impermeável entre o ambiente e o organismo (JENSEN & PROKSCH, 2009). Ela é formada majoritariamente por queratinócitos dispostos em subcamadas ou estratos, que representam as diferentes fases de maturação dessas células (POTTER, 1966). A divisão celular inicia-se no estrato mais interno, denominado basal, no qual queratinócitos pouco diferenciados se dividem e migram para o superior, denominado espinhoso, tornando-se células mais densas. À medida que progridem em direção à superfície, se movem para o estrato superior, chamado granuloso, onde acumulam grânulos de lipídeos, essenciais para a manutenção da barreira hidrolipídica. Com a progressão da diferenciação, há perda nuclear dos queratinócitos, que apresentam nas subcamadas mais superiores morfologia achatada ou córnea com produção de queratina e lipídios, que são secretados para os domínios extracelulares. No estrato lúcido ocorre a pigmentação, que é proporcionada pela transferência de melanina pelos melanócitos. O estrato mais externo, denominado córneo, representa o resultado final da diferenciação e é formado por queratinócitos mortos completamente diferenciados e ricos em proteínas, denominados corneócitos, entremeados por domínios lipídicos intramembranosos. A epiderme nucleada, com juncos aderentes do tipo *gap* e *tight*, desmossomos e elementos do citoesqueleto também contribuem para que a pele tenha uma barreira física protetora. (AJANI et al., 2007).

Na região basal existem também sítios de melanócitos, células que produzem melanina, o pigmento castanho que dá cor à pele e a protege contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta dos tipos A e B; eles são encontrados na proporção 1:20 em relação aos queratinócitos. Há, ainda,

nesse local, a presença de células de Merkel, que desempenham função sensorial; células de Langerhans, dendríticas abundantes na epiderme que, na condição de histiocitose, são responsáveis pelo controle imunitário; células de Toker, presentes no epitélio de mamilos e com função pouco conhecida; e linfócitos (TOKER, 1970; FELICIANI et al., 1996; PHILLIPS, 1998; RÉGNIER et al., 1998; LUNDQUIST et al., 1999; RÉGNIER et al., 1999; BOYCE & WARDEN, 2002; KANITAKIS, 2002; TIZNADO-OROZCO & OREA-SOLANO, 2004).

Abaixo à epiderme, entre esta e a derme, localiza-se um sistema de conexões fibrilares que ancoram a camada epidérmica, denominado membrana ou lâmina basal. Esta é composta principalmente de colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, bem como fatores de crescimento; e controla o tráfego de moléculas bioativas em ambos os sentidos (BALASUBRAMANI et al., 2001; HORCH et al., 2005; IOZZO, 2005; AJANI et al., 2007; GODIN & TOUITOU, 2007).

A matriz dérmica, logo abaixo à membrana basal, fornece energia e nutrição para a epiderme sobrejacente e sustenta a pele, em virtude de suas fibras colagênicas. A malha de colágeno, principalmente tipo I, é intercalada com fibras de elastina, fibronectina, proteoglicanos, glosaminoglicanos, ácido hialurônico e outros componentes. O principal componente celular é o fibroblasto, que apresenta inúmeras funções, como síntese e deposição de componentes da matriz extracelular (MEC) e modulação de proliferação e migração de células vizinhas. São encontrados ainda dentríticas residentes e mastócitos. Há também a presença de outras células do sistema imune e vários apêndices, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, terminações nervosas e vasos linfáticos e sanguíneos (BALASUBRAMANI et al., 2001; WONG et al., 2007).

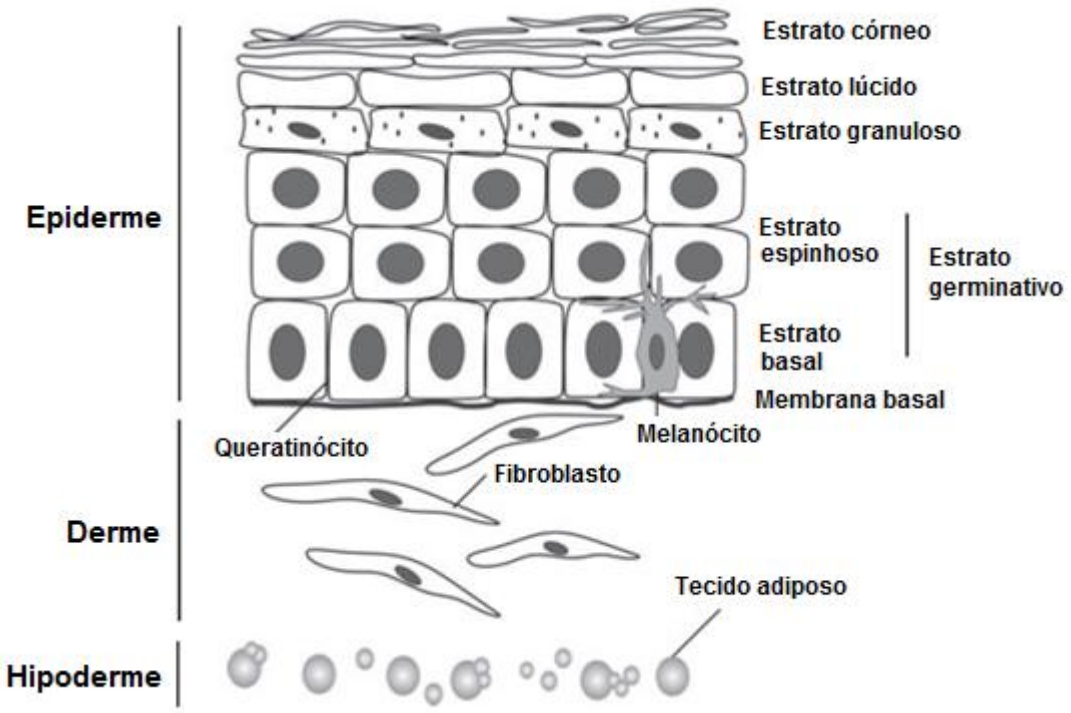


Figura 1. Camadas da pele e seus componentes celulares. A pele é dividida histologicamente em duas camadas principais, a epiderme e a derme. A epiderme é subdividida em estratos, que são organizados de acordo com o grau de diferenciação do queratinócito; ela ainda é composta de melanócitos, localizados próximos à membrana basal. A derme é composta majoritariamente por fibroblastos. A hipoderme, tecido adiposo anexado estruturalmente à pele, é composta de células adipócitas. Adaptado de Brohem et al., 2010.

O melanoma cutâneo humano

Câncer é o termo usado para designar malignidade celular, cuja característica principal é a perda do controle normal da proliferação e crescimento celular. Isso leva à desdiferenciação celular, crescimento desregulado e invasão de tecidos locais e à distância (metástases). O controle do câncer pode ser obtido por meio de prevenção, detecção precoce e terapêutica cirúrgica e/ou quimioterapia (TAVANI et al., 1997; GIOVANUCCI, 1998; LIMA, 2004).

As neoplasias malignas são a segunda maior causa de óbito nos países desenvolvidos, sendo responsáveis por cerca de 25% das mortes. O câncer de pele, incluindo melanoma, corresponde a mais de um milhão de novos casos por ano nos Estados Unidos e cerca de 120 mil novos casos no Brasil. Desse total, cerca de 4% são melanomas (INCA, 2010; NCBI, 2010).

O melanoma é responsável por 75-80% das mortes relacionadas ao câncer de pele, sendo em muitos países considerado um problema de saúde pública, embora seja quase sempre curável se descoberto em seus estágios iniciais (FIDLER, 2003; NCBI, 2010). Sua letalidade é elevada, porém sua incidência é baixa. Para 2010, estavam previstos 2.950 casos novos em homens e 2.970 casos novos em mulheres, segundo a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sudeste (INCA, 2010).

A taxa média de sobrevida dos indivíduos diagnosticados com melanoma está entre 6 e 9 meses, devido à alta resistência da doença à terapia e a sua rápida progressão tumoral (BENJAMIN et al., 2007). O prognóstico ruim e a ausência de biomarcadores efetivos para a identificação do estágio da progressão tumoral são as principais causas que levam os indivíduos à ulcerações, deformidades físicas graves e morte (IBRAHIM & BROWN, 2008; INCA, 2010).

Melanócitos, após a divisão celular, separam-se e migram ao longo da membrana basal; eles estendem seus dendritos e estabelecem múltiplos contatos com queratinócitos. Uma vez que a adesão é estabelecida, os queratinócitos controlam o crescimento e a expressão de receptores da superfície celular de melanócitos. A maioria dos melanomas surge dentro da

epiderme (melanoma *in situ*) e, então, invadem a membrana basal. De acordo com Haass e Herlyn, 2005, essas células tumorais escapam do controle dos queratinócitos através de cinco mecanismos principais: (1) baixa regulação de receptores importantes para a comunicação com queratinócitos, como E-caderina, P- caderina e desmogleína, conseguidos através de fatores de crescimento como fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento derivado de plaquetas e endotelina-1 produzidos por fibroblastos e queratinócitos; (2) alta regulação de receptores e moléculas de sinalização importantes para interações de células de melanoma-melanoma e fibroblasto-melanoma, tais como N-caderina, Mel-CAM e proteína-1 de zônula de oclusão; (3) desregulamentação de morfógenos, como receptores Notch e seus ligantes; (4) perda de ancoragem à membrana basal, causada pela expressão alterada de moléculas de adesão célula-matriz; e (5) produção exarcebada de metaloproteinases.

Na pele, o crescimento ou alteração da forma de lesão precursora é progressivo e se faz no sentido radial ou vertical (*nevus*). Na fase de crescimento radial, a neoplasia invade horizontalmente a epiderme, podendo atingir ou não a derme papilar superior. No sentido vertical, o seu crescimento é acelerado através da espessura da pele, podendo romper a membrana basal e formar nódulos visíveis e palpáveis (FIDLER, 2003; LOEFFEK et al., 2006).

Durante sua progressão, melanócitos malignos, de origem epidérmica, atravessam a barreira dermo-epidérmica e depois migram para a derme, principal local da propagação do melanoma (NTAYI et al., 2004). Para isso, há degradação dos constituintes da matriz da membrana basal e do tecido dérmico por enzimas proteolíticas secretadas por aquelas células transformadas, para finalmente migrarem em direção à corrente sanguínea (FIDLER, 2003; LOEFFEK et al., 2006; LEWINSKA et al., 2007; WEISZ et al., 2007). As principais enzimas envolvidas neste processo correspondem às famílias das serino-proteases e metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs são expressas em baixos níveis em condições fisiológicas, porém aumenta dramaticamente em inúmeros tipos de câncer, sendo um indicador de doença invasiva com péssimo prognóstico clínico (HUNTINGTON et al., 2004).

Dentre as MMPs, a expressão de MMP-1, -2, -3, -9, -10 e -14 pelas células de melanoma têm sido demonstrada *in vitro* e *in vivo* e correlacionada

ao fenótipo invasivo. Além de remodelar os componentes da matriz, as MMPs podem decompô-los, como fatores de crescimento e citocinas (HOFMANN et al., 1999; WALKER & WOOLLEY, 1999; BRINCKERHOFF et al., 2000; HOFMANN et al., 2000; NIKKOLA et al., 2002; HOFMANN et al., 2005).

As MMPs não são produzidas apenas pelas células malignas, mas também pelo estroma adjacente, sugerindo um importante papel da interação do microambiente (EGEBLAD & WERB, 2002; SINGER et al., 2002; MAREEL & LEROY, 2003). Estudos em humanos mostram uma associação direta entre aumento da expressão de MMPs e invasão tumoral e desenvolvimento de metástases (EGEBLAD & WERB, 2002; MYSLIWIEE et al., 2002; SHEU et al., 2003). Níveis elevados de diferentes MMPs podem ser detectados nos tecidos tumorais ou no soro de pacientes em estágios de câncer avançado e seu papel como indicador de prognóstico em neoplasias vem sendo estudado (SHEU et al., 2003; LA ROCCA et al., 2004).

As mudanças a partir do remodelamento desses componentes presentes na matriz podem influenciar a proliferação, sobrevivência, vascularização, expressão de proteases e migração das células tumorais. Portanto, o uso de inibidores, a fim de regular a expressão, ativação e atividade de MMPs, poderia permitir o controle de processos celulares envolvidos na progressão do melanoma (NTAYI et al., 2004; CLARK et al., 2008), embora testes clínicos realizados por Chu e colaboradores, 2007, demonstram que o COL-3, potente inibidor de gelatinases *in vitro*, não foi capaz de conter a progressão tumoral e aumentar a sobrevida em pacientes com sarcoma metastático.

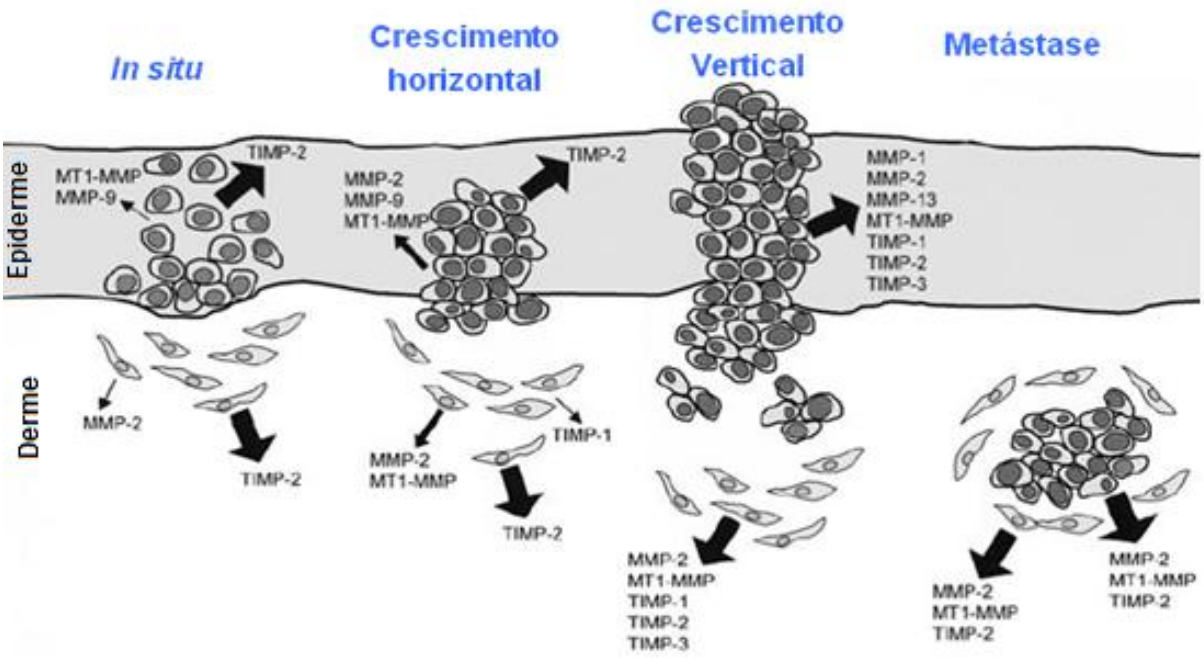


Figura 2. Progressão do melanoma. O melanoma inicia-se na camada basal, local de origem dos melanócitos, sendo denominado *in situ*. Pode se alastrar pela epiderme (crescimento radial ou horizontal), podendo ou não romper a membrana basal. Pode também se difundir verticalmente pela epiderme (crescimento vertical), formando nódulos visíveis e palpáveis, e invadir a derme, principal sítio de propagação do melanoma. Na derme, pode migrar em direção aos vasos sanguíneos, podendo, então, atingir e colonizar outros tecidos, fenômeno denominado metástase. Nesses processos, há o envolvimento de várias metaloproteinases de matriz (MMPs), metaloproteinases de matriz aderidas à membrana celular (MT-MMPs) e seus inibidores (TIMPs), que participam da degradação da matriz extracelular, facilitando a invasão do melanoma. Adaptado de Hofmann et al., 2000.

A quimiorresistência a fármacos é um problema central na terapia de melanoma. Um dos mecanismos mais conhecidos é o de resistência a múltiplas drogas (MDR) e em melanomas é ocasionado pela expressão elevada de transportadores do tipo *ATP-binding cassette* (ABC), acompanhada pela síntese de P-glicoproteína, produto do gene MDR1/ABCB1. Várias proteínas da superfamília ABC são responsáveis pelo bombeamento de compostos antitumorais, externalizando os fármacos e cumprindo, assim, um papel importante na transformação neoplásica (CHILDS & LING 1994; DEICHMANN et al., 2005). Em melanomas, há ainda outro mecanismo de quimiorresistência importante, que utiliza os melanossomas, estruturas celulares produtoras de melanina, que captam, degradam e externalizam os

fármacos, impedindo que estes tenham ação intracelular. Através de endocitose, os compostos são absorvidos e encapsulados juntamente com a melanina em melanossomas, que posteriormente são externalizadas via autofagia (CHEN et al., 2006).

A evasão à morte por apoptose em resposta à quimioterapia permite vantagem seletiva para progressão tumoral e formação de metástase. (HERSEY & ZHANG, 2001; SOENGAS & LOWE, 2003; LA PORTA, 2007). As células tumorais acumulam uma série de alterações genotípicas que favorecem a proliferação descontrolada, evasão de senescência e inibição de morte celular por alteração de múltiplas rotas intracelulares. Os membros da família antiapoptótica Bcl-2, como Bcl-2, Bcl-x_L e Mcl-1, são superexpressos em melanoma e atuam conjuntamente na inibição de morte celular programada. Além da inativação de vias de morte celular, a maioria dos melanomas humanos possui autossuficiência no crescimento através da aquisição de mutações ativadoras de B-RAF e das vias MAPK e MEK/ERK, proteínas importantes de proliferação e sobrevivência celular, que também contribuem para o fenótipo de quimiorresistência elevada (BOLLAG et al., 2010; OSSOWSKI & AGUIRRE-GHISO, 2010; SMALLEY, 2010).

Segundo a revisão de Garbe e colaboradores, 2011, as opções de tratamento em melanoma são limitadas mesmo a despeito dos avanços na imunoterapia e na terapia direcionada a alvos gênicos. As recentes estratégias terapêuticas para melanoma incluem tratamento direcionado à indução de respostas pró-apoptóticas, como o Tasisulam (Eli Lilly and Company, Indianapolis), que atua como indutor de apoptose via mitocondrial; estratégias de supressão de precursores da via MAPK, usando inibidores como o Sorafenib (Nexavar, BAY 43–9006; Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc., Wayne, New Jersey, and Onyx Pharmaceuticals, Inc., Emeryville, California); e inibição de alvos terapêuticos ainda mais específicos como a mutação V600E em BRAF, utilizando o inibidor seletivo PLX4032 que reconhece tal mutação, importante por estar em presente em 50% dos pacientes com melanoma (GOYDOS et al., 2005). Tais estratégias foram uma grande evolução no tratamento dessa neoplasia, embora tenham uso limitado a alguns pacientes e apresente diversos efeitos colaterais (FECHER et al., 2008; MADHUNAPANTULA & ROBERTSON, 2008).

O PLX4032 causou grande impacto em termos de poder terapêutico, pois foi capaz de induzir parada do ciclo celular e apoptose, além inibir da proliferação exclusivamente em células V600E positivas em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Em 2010, os dados de fase clínica III foram dramáticos, com alguns pacientes chegando a 80% de redução dos sítios metastáticos após o uso diário do PLX4032, com baixa toxicidade relatada. Infelizmente, dados recentes discutem que esse composto torna-se ineficiente após sete meses de terapia, com recidiva do tumor (LEDFORD, 2010). Portanto, ainda é necessária a busca de novas estratégias mais eficientes para a terapia de melanoma e que abrajam outros mecanismos de transformação e progressão dessa neoplasia. Neste aspecto, existe uma necessidade urgente de desenvolver marcadores moleculares que identifiquem pacientes com lesões de alto risco, melhorando a prospecção e possibilitando terapia adjuvante (SMALLEY, 2010).

Em busca de novas terapias, a interação entre as células tumorais e o estroma adjacente é um alvo importante na progressão tumoral. De forma recíproca, a célula tumoral e o microambiente alteram os tecidos adjacentes e modulam o metabolismo das células residentes por meio de fatores de crescimento, citocinas e proteases, como as metaloproteinases (MMPs), resultando na formação de estroma mais propício para o estabelecimento das células tumorais (MUELLER & FUSENIG, 2004; ZIGRINO et al., 2005).

CAPÍTULO I: RECRIANDO *IN VITRO* O PROCESSO INVASOR DO MELANOMA EM EQUIVALENTE DÉRMICO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele e modelos experimentais

O microambiente é necessário para a diferenciação do melanócito, uma vez que, na proliferação em monocamada, estas células apresentam a morfologia bi ou tripolar e expressam antígenos associados ao melanoma. Entretanto, em coculturas com queratinócitos, os melanócitos assumem um fenótipo semelhante àquele que ocorre *in vivo*, isto é, mantêm constante a razão numérica em relação aos queratinócitos, assumem a morfologia multidendrítica e não expressam os antígenos característicos de melanoma. Os melanócitos são funcionais e os melanossomos provenientes dos melanócitos podem ser transferidos com sucesso para os queratinócitos no modelo de pele artificial (HAASS & HERLYN, 2005).

Schittek et al. (2007) utilizaram compartimento dérmico reconstituído *in vitro* para análises de proliferação, migração e invasão de células de melanoma metastático humano SK-Mel-28. Culturas celulares em monocamadas normalmente não refletem as mudanças que ocorrem nos estágios iniciais de progressão e na morfologia e expressão de genes relacionados ao crescimento, migração e invasão de melanócitos normais, células de *nevus* ou células de melanomas. A utilização de culturas organotípicas, como pele humana reconstituída, retrata com fidelidade as interações célula-matriz e célula-célula entre diferentes tipos celulares, tão importantes no processo de desenvolvimento do tumor (BERKING & HERLYN, 2001).

Ponec e Kempenaar (1995) utilizaram recombinações de duas subcamadas de pele humana, epiderme reconstruída sobre derme epidermizada (RE-DED) ou sobre matriz de colágeno povoada por fibroblastos (*Living Skin Equivalent*, LSE), para estudar o efeito citotóxico de lauril sulfato de sódio. Duc et al. (2007) utilizaram substitutos de pele humana, compostos

por epiderme autóloga reconstruída sobre derme humana povoada com fibroblastos e sobre gel de colágeno tipo I de rato povoado por fibroblastos, para avaliação da citotoxicidade, atividade metabólica e análise de RNA. Em suma, estas pesquisas comprovam que o modelo tridimensional é o que mais se aproxima dos efeitos que ocorrem *in* vivo, além do menor custo em relação aos modelos animais vivos; e incentivo à pesquisa de medicamentos de administração tópica (GENTILHOMME et al., 1998; ROGUET, 1999).

Sendo assim, estudos que resgatam a fisiopatologia tumoral, considerando importantes elementos como o estroma, recriam com maior fidelidade as interações célula-célula e célula-matriz *in vitro*. Modelos mais fiéis são necessários para triar as doses terapêuticas dos medicamentos que serão testados em ensaios pré-clinicos *in vivo* e clínicos, a fim de potencializar a ação do fármaco e minimizar os efeitos colaterais.

1.2. Intercalantes de DNA

Diversos antitumorais utilizados clinicamente são substâncias que apresentam mecanismo de ação relacionado ao ácido desoxirribonucléico (DNA), interferindo na proliferação das células tumorais. Os tipos mais utilizados são oriundos de produtos naturais, complexos de coordenação de platina, agentes alquilantes e agentes intercalantes, que, embora apresentem atividade antitumoral considerável por interferirem no ciclo celular das células neoplásicas, não são específicos, apresentando diversos efeitos colaterais, como cardio e hepatotoxicidade (GOTTLIEB & DREWINKO, 1975; MARSH, 1976; KOREN et al., 1992; EL-SAYYAD et al., 2009; EL-AWADY et al., 2011; GHIBU et al., 2011).

Os intercalantes de DNA podem ser classificados como: inibidores da síntese de nucleotídeos, através do uso de análogos de bases nitrogenadas; agentes alquilantes, como as mostardas nitrogenadas, nitrossuréias, complexos tipo cisplatina e outros; ligantes que interagem com o DNA, como berenil, pentamidina e análogos; intercalantes de DNA, que alteram o pareamento das bases e impedem a replicação, como proflavina, acridina, amsacrina e doxorrubicina (CONNORS, 1974; BARUAH et al., 2004; MARTÍNEZ & CHACÓN-GARCÍA, 2005; STREKOWSKI & WILSON, 2007).

A intercalação geralmente altera a estrutura do B-DNA, com o aumento no espaçamento dos pares de base CG de 3,4 Å (angstrom) para cerca de 7 Å. É descrito que o mecanismo de ação desta classe baseia-se na formação de um trímero constituído pelo intercalante, DNA e topoisomerase II. Este trímero seria estabilizado e interromperia a separação das bases nitrogenadas do DNA, necessária à replicação e transcrição (BENEVIDES & THOMAS, 2005). Devido a esta característica, os intercalantes são constituídos por anéis aromáticos fundidos, apresentando alta densidade eletrônica. Algumas destas moléculas foram descritas como ativas, tendo como alvo biológico as topoisomerases I e II, entretanto a correlação entre a intercalação e a interação com a topoisomerase II ainda não foi definida, sendo objeto de diversos estudos (BENBOW et al., 1999; ALBRIGHT et al., 2005).

1.3. Doxorrubicina: eficácia e toxicidade

A doxorrubicina, também conhecida como adriamicina e hidroxidaunorubicina, é um antibiótico antracíclico derivado do produto natural daunorubicina, isolado em 1939 a partir de cepas de *Streptomyces peucetius* (AUBEL-SADRON & LONDOS-GAGLIARDI, 1984).

Esse fármaco é um dos mais extensamente utilizados no tratamento de tumores sólidos, como os de mama, fígado e sarcomas, e cânceres do sistema hematopoiético, como o linfoma não-Hodgkin (MUGGIA & GREEN, 1991). Em tumores sólidos, é administrado na faixa de 40 mg/m^2 de superfície corporal, sendo utilizado na clínica, para o tratamento de neoplasias (KOLARIĆ et al., 1977; SESSA et al., 1999). O composto é administrado por via endovenosa, sob a forma de cloridrato. Em leucemias, apresenta efeito caracterizado pela diferenciação de células tumorais (YAMADA et al., 1999).

O mecanismo de ação baseia-se na intercalação desse fármaco com o DNA, afetando a síntese de ácidos nucléicos, além de promover a parada da topoisomerase II (ALBRIGHT et al., 2005; BENBOW et al., 1999).

Apesar de ser um quimioterápico clássico, utilizado desde a década de 60 para o tratamento de neoplasias, infelizmente seu uso clínico é limitado, devido à sua toxicidade dose-dependente. Seus principais efeitos colaterais são cardiotoxicidade, alopecia, náuseas, estomatite e neutropenia. Muitos

trabalhos relatam que esse fármaco interage com lipídeos da membrana celular (HORTOBÁGYI, 1997; AGARWALA et al., 2000; INJAC & STRUKELJ, 2008; CASCALES et al., 2010). Atualmente é utilizado em terapia combinatória e há muitos estudos com análogos e com lipossomas, a fim de melhorar sua absorção, para diminuir a quimiorressistência e a interação com células saudáveis (STORM et al., 1987; YOKOYAMA et al., 1991; MARUYAMA et al., 1993; ANDROULAKIS et al., 2002; GALSKY et al., 2007; MUNSTER et al., 2009; ABOU-ALFA et al., 2010; JIN et al., 2010; IQBAL et al., 2011).

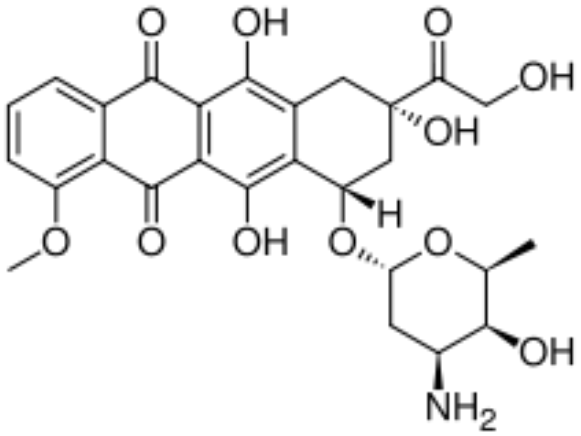


Figura 3. Fórmula estrutural de doxorrubicina.

A eficácia de compostos antitumorais usados clinicamente é limitada pela toxicidade não específica em células normais proliferativas, resultando em baixo índice terapêutico. Desta forma, potencializar a ação de novos compostos por combinação de fármacos é uma alternativa possível de tratamento. Em estudos com camundongos, a doxorrubicina em combinação com outros agentes quimiopreventivos diminuiu a formação de tumor e metástase no modelo de melanoma murino B16 (BENBOW et al., 1999). O efeito potencializado de morte celular foi observado na combinação de bortezomibe e doxorubicina em melanoma (FERNÁNDEZ et al., 2005).

Em pacientes com melanoma, a doxorrucina não apresenta ação efetiva, devido à alta quimiorresistência das células tumorais, embora apresente atividade antineoplásica *in vitro*, com indução de morte celular induzida por ativação da via intrínseca (GERNER et al., 1975; BONFANTE et al., 1979; KÜHBÖCK et al.,1978; ARANCIA et al., 2001; GRUBER et al., 2001; NEALE et

al., 2001; SIGNORELLI et al., 2005). Benbow e coautores (1999) reportaram a ação da doxorrubicina em baixas concentrações como inibidora da expressão de MMP-1 na linhagem metastática de melanoma humano A2058, diminuindo o tempo de invasão desta linhagem em colágeno.

2. OBJETIVO

Avaliar a citoxicidade da doxorubina sobre melanoma em diferentes condições de cultura celular, comparando células em monocamadas, em equivalente dérmico e sobre colágeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

As linhagens de melanoma metastático humano utilizadas neste trabalho foram SK-Mel-19, -103 e -147, cujas mutações estão descritas na tabela 1. Também foram utilizadas culturas primárias de fibroblastos humanos normais FF287, para a realização do equivalente dérmico e controle. Todas as linhagens e culturas primárias foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. María Soengas, (CNIO, Espanha).

Tabela 1. Linhagens de melanoma metastático humano utilizadas no projeto, disponíveis no Laboratório de Patologia e Citologia Clínica – FCF/USP

	p53	p53 induzido	p14 (RNAm)	p16 (RNAm)	B-RAF (V599E)	N-Ras (éxon 3)	Apaf-1 (prot.)	Casp. 8 (prot.)	Bcl-2 (prot.)	Bcl-xL (prot.)	Mcl-1
SK-Mel-19	wt	+	+	+	mutante	wt	++	++	+++	++	ND
SK-Mel-103	wt	+	+	+	wt	Q61R	-	+	++	+++	+++
SK-Mel-147	wt	+	-	+	wt	Q61R	-	+	++	+++	+++

Legenda:

- wt: *wild-type* (selvagem);
- RNAm: RNA mensageiro;
- ND: não detectado;
- prot.: proteína;
- B-RAF (V599E): mutação ocasionada pela transversão de timina por adenina, no códon 1796 (A1796T), que resulta na substituição de valina por ácido glutâmico no códon 599. Ocorre em aproximadamente 50% dos melanomas (GOYDOS et al., 2005);
- N-Ras (exon 3) Q61R: mutação majoritariamente no códon 61, presente no éxon 3, ocasionada pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 182 (A182G), que resulta na substituição de glutamina por arginina. Ocorre em aproximadamente 20% dos melanomas (FUKUSHIMA & TAKENOSHITA, 2005; GOYDOS et al., 2005).

3.2. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas em estufa de cultura celular a 37°C, em placas de cultura contendo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - GIBCO) acrescido de 10% de SFB (Soro Fetal Bovino - GIBCO), 25 µg/mL de ampicilina e 100 µg/mL de streptomicina, em atmosfera de 5% de CO_2, para manutenção de pH próximo ao fisiológico. As células foram subcultivadas assim que atingiram 70-80% da densidade de saturação, utilizando, para tanto, lavagem prévia da cultura com solução de PBS·A 1x (tampão fosfato salino livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}) e, posteriormente, tripsina 0,1% em PBS·A contendo 1 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultivo contendo DMSO 8% (dimetilsulfóxido) a -196°C, em reservatório com nitrogênio líquido.

3.3. Geração de equivalentes dérmicos normais e com melanomas (adaptado de Maria e Wada, 1996, e Boccardo et al., 2004)

O colágeno foi obtido na forma de gel hidratado e estéril, proveniente de extração de colágeno tipo I de tendão de cauda de ratos Wistar, segundo Maria e Wada (1996) e Boccardo et al. (2004). O equivalente dérmico foi obtido mediante a ressuspensão de fibroblastos em mistura de colágeno composta de 2,5 mg/mL de colágeno tipo I (7,5/10 volume final), SFB (0,5/10 volume final), tampão de reconstituição 10x (0,05 M NaOH, $NaHCO_3$ 2,2%, 200 mM HEPES - 1/10 volume final) e meio HAM-F12 10x (GIBCO) (1/10 volume final).

Para os ensaios de invasão de células de melanoma em equivalente dérmico, ressuspendeu-se $1,5x10^5$ fibroblastos na mistura de colágeno, que foi transferida para placas de 24 poços (1 mL/poço) e, após a gelificação em estufa à 37°C, em atmosfera de 5% de CO_2, foi adicionado meio de cultura (1 mL/poço) contendo células de melanoma metastático humano SK-Mel-103 (10^5 células/mL), com posterior cultivo em estufa em atmosfera de 5% de CO_2, a 37°C. O meio foi trocado a cada dois dias. O material foi emblocado em parafina e submetido a cortes finos para posterior análise em microscopia óptica.

Para os demais ensaios (citotoxicidade, Western Blot, FACS, etc.), ressuspendeu-se 10^6 fibroblastos em 600 µL de mistura de colágeno, que foi transferida para placa de 60 mm de diâmetro, com posterior plaqueamento de $5,5x10^5$ células de melanoma/placa.

3.4. Preparo do substrato e geração de colágeno tipo I com melanomas

Para os ensaios de invasão de células de melanoma em colágeno tipo I, a mistura de colágeno (SBF - 0,5/10 volume final; tampão de reconstituição 10x - 1/10 volume final; HAM-F12 10x - 1/10 volume final) foi transferida para placas de 24 poços (1 mL/poço) e, após a gelificação em estufa à 37°C, em atmosfera de 5% de CO_2, foi adicionado meio de cultura (1 mL/poço) contendo células de melanoma metastático humano SK-Mel-103 (10^5 células/mL), com posterior cultivo em estufa em atmosfera de 5% de CO_2, a 37°C. O meio foi

trocado a cada dois dias. O material foi emblocado em parafina e submetido a cortes finos para posterior análise em microscopia óptica.

Para os demais ensaios (citotoxicidade, Western Blot, FACS, etc.), 600 µL de mistura de colágeno/poço em placa de 60 mm de diâmetro, com posterior plaqueamento de $5,5x10^5$ células de melanoma/placa.

3.5. Tratamento das células

Para avaliação da inibição da viabilidade sobre as células de melanoma cultivadas em diferentes substratos, foram utilizadas as concentrações de 0 a 2,76 µM de doxorrubicina (adriamicina) (Fischer), determinadas a partir da literatura. Para realização do outros ensaios, foram utilizadas as concentrações correspondentes ao IC_{50} (concentração do fármaco que inibe 50% das células) de linhagens de melanoma cultivadas sobre equivalente dérmico.

3.6. Condições experimentais

Para a realização dos ensaios, utilizaram-se células de melanoma plaqueadas sobre diferentes substratos, conforme esquema a seguir (fig. 4). Para controle do ambiente biomimético com fibroblastos, utilizou-se equivalente dérmico sem melanoma.

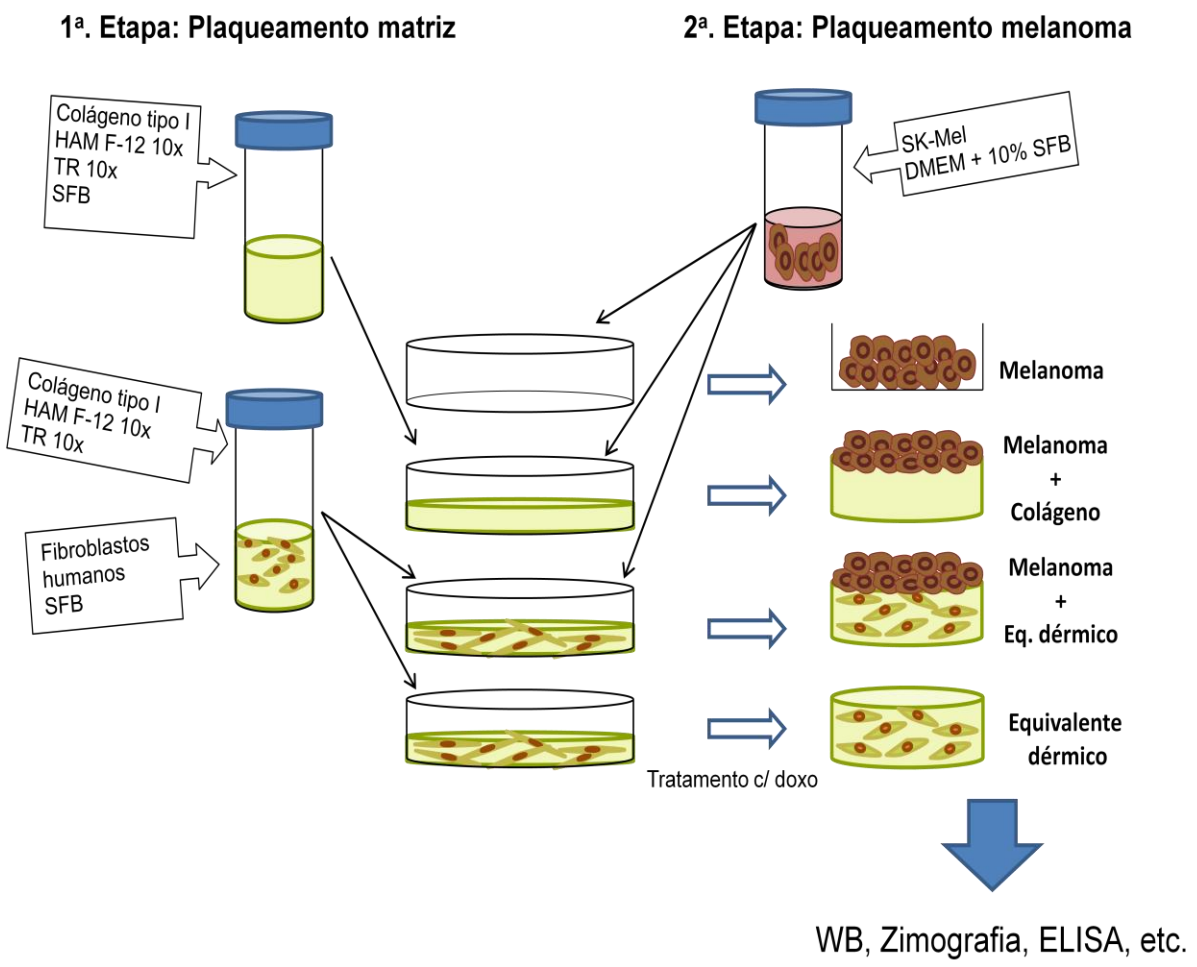


Figura 4. Esquema de plaqueamento das linhagens de melanoma sobre diferentes substratos. Primeiramente, realizou-se uma mistura de colágeno, composta de colágeno tipo I, HAM-F-12 10x e tampão de reconstituição (TR) 10x. À mesma, adicionaram-se os fibroblastos já ressuspendidos em SFB. Para plaqueamento de colágeno, não se adicionou os fibroblastos. Após gelificação do colágeno, adicionou-se meio contendo as células de melanoma (exceto no controle da derme, composto somente de colágeno tipo I e fibroblastos). Vinte e quatro horas após o plaqueamento, as culturas foram tratadas com doxorrubicina e após o tempo de tratamento determinado (48 horas), realizou-se os ensaios pertinentes.

As condições utilizadas neste estudo foram:

i) melanoma cultivado sobre plástico, em monocamada (M);

ii) melanoma cultivado sobre colágeno tipo I (M+Col);

iii) melanoma cultivado sobre equivalente dérmico, composto de fibroblastos embebidos na matriz de colágeno tipo I (M+Eq);

iv) equivalente dérmico (Eq).

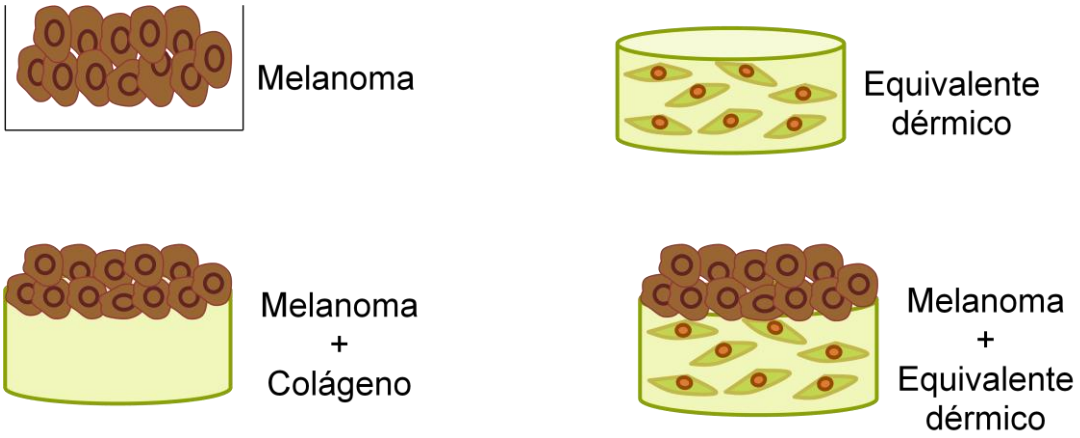


Figura 5. Esquema das condições utilizadas no trabalho. Melanoma (M), correspondente à linhagem tumoral em monocamada, ou seja, plaqueada sobre plástico, na ausência de substrato; Melanoma + Colágeno (M+C), correspondente à linhagem tumoral plaqueada sobre uma matriz colagênica, composta unicamente de colágeno tipo I; Melanoma + Equivalente dérmico (M+Eq), correspondente à linhagem tumoral plaqueada sobre uma matriz de colágeno tipo I povoada com fibroblastos humanos normais; Equivalente dérmico (Eq), correspondente à matriz de colágeno tipo I povoada com fibroblastos humanos normais.

3.7. Digestão da matriz colagênica e coleta das células

Para a realização dos ensaios, quando as células foram cultivadas sobre colágeno tipo I ou equivalente dérmico, foi necessária a digestão do colágeno para coleta das células. Para tanto, utilizou-se colagenase tipo I (Sigma-Aldrich) na concentração final de 1 mg/mL. Após adicionar a colagenase, as culturas foram colocadas em estufa a 37ºC e, após a degradação da matriz, no período de 20-30 minutos, as células foram coletadas.

3.8. Viabilidade celular

3.8.1. Exclusão por Azul de Tripan

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão por corante Azul de Tripan 0,4% em PBS (FRESHNEY, 1987), no qual as células foram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentaram a coloração azul em seu interior. Para a realização do ensaio, as células foram plaqueadas e após atingirem 50% de confluência, em média 24 horas após o plaqueamento, o meio foi retirado e, então, adicionou-se meio com diferentes concentrações do fármaco. Posterior a essa etapa, para leituras de tempos distintos, as células foram coletadas através de tripsinização e/ou tratamento com colagenase (1 mg/mL) e adicionou-se à suspensão de células o corante Azul de Tripan 0,4%, na proporção de 1v/1v com DMEM. Foram contadas aproximadamente 100 células viáveis por campo na câmera de Neubauer. Para células de melanoma cultivadas sobre equivalente dérmico, realizou-se contagem de todas as células presentes no poço, sem separação prévia. O programa Microsoft Excel® foi utilizado para os cálculos das médias e desvios-padrão e confecção dos gráficos.

3.9. Caracterização de morte celular

3.9.1. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) para identificação do tipo de morte cellular

Para o ensaio, utilizou-se marcação celular com os fluróforos Anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP), no qual, através de marcação dupla, é possível diferenciar células em apoptose, necrose ou apoptose tardia/necrose. Células que possuem membrana celular íntegra apresentando o receptor para fosfotidilserina incorporam o fluoróforo Anexina V-FITC, sugerindo processo apoptótico, enquanto que o iodeto de propídeo é incorporado por células que apresentam ácidos nucléicos expostos, ou seja, rompimento da membrana celular, o que sugere processo necrótico. Dupla marcação sugere processo apoptótico tardio ou necrose com exposição do receptor de fosfatidilserina. Células viáveis, ou seja, que não apresentam a externalização do receptor e

possuem membrana celular íntegra, não apresentam incorporam fluoróforo (GIVAN, 2001).

Para a realização do ensaio, foram utilizadas células de melanoma SK-Mel-103 e fibroblastos FF287. As células foram cultivadas e, após atingirem aproximadamente 50% de confluência, tratadas com a concentração referente ao IC_{50} das células de melanoma cultivadas sobre equivalente dérmico (1,2 µM) por 48 horas. Após o tratamento, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS e uma vez com tampão de ligação (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$). As células foram ressuspendidas em 100 µL de tampão de ligação contendo Anexina V-FITC na diluição 1:500 e incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Acrescentou-se 400 µL de tampão de ligação e, no caso de marcação dupla com iodeto de propídio (IP), adicionou-se às células 40 µL de solução de IP (100 µg/mL em tampão de ligação). As amostras foram analisadas imediatamente em citômetro de fluxo. Utilizaram-se os softwares FlowJo™ e Microsoft Excel® para a confeccção dos gráficos.

3.9.2. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) para avaliação de fragmentação de DNA em células com GFP (Green Fluorescent Protein)

Para a realização do ensaio, foram utilizadas células de melanoma SK-Mel-103 transfectadas com o vetor lentiviral pLV-LC3 II-GFP (doadas gentilmente pelo Ms. Renato R. Massaro, FCF-USP) e fibroblastos FF287 sem o vetor. As células foram cultivadas e, após atingirem aproximadamente 50% de confluência, tratadas com a concentração referente ao IC_{50} das células de melanoma cultivadas sobre equivalente dérmico (1,2 µM). Após o tratamento, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS e incubadas por 30 minutos com solução de iodeto de propídeo (IP) 100 µg/mL em PBS, no escuro. As amostras foram analisadas imediatamente em citômetro de fluxo. Utilizaram-se os softwares FlowJo™ e Microsoft Excel® para a confeccção dos gráficos.

3.10. Análise de expressão proteica através de ensaios de Western Blot

3.10.1. Extração proteica

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro. Quando as culturas atingiram aproximadamente 50% de confluência, as células foram tratadas com a concentração referente ao IC_{50} das células de melanoma cultivadas sobre equivalente dérmico (1,2 µM) por 48 horas. Após o tempo de tratamento, as culturas foram coletadas através de tripsinização e/ou tratamento com colagenase (1 mg/mL), seguida de centrifugação. Adicionou-se ao *pellet* 70-100 µL de tampão de lise Laemmili (62,5 mM Tris-base pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%). A fração citoplasmática foi coletada e o material foi estocado a - 80°C.

3.10.2. Fracionamento de proteínas utilizando eletroforese em gel de acrilamida e reação com o anticorpo

As amostras foram normalizadas de acordo com a quantidade de proteína, utilizando-se o método de Bradford (1976), com o uso de Reagente de Bradford (Bio-Rad) e curva padrão de BSA (albumina sérica bovina). Em geral, utilizou-se 30 µg de proteína total para cada canal.

Utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (30 acrilamida: 1 bisacrilamida) de 10 a 15% para fracionamento das proteínas. Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, utilizando-se transferência úmida a 4°C. As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio constituída de 5% de leite desnatado em pó em PBS acrescido com 0,02% de Tween 20, à temperatura ambiente, por aproximadamente 1 hora e incubadas *overnight* (16 a 20 horas) com o anticorpo desejado diluído em solução de bloqueio, com agitação, a 4°C. Os anticorpos utilizados foram anti-human p53 (Vector), anti-human caspase 3 (Cell Signaling), anti-human caspase 9 (Cell Signaling) e anti-human β-actin (Cell Signaling). As membranas foram então lavadas três vezes em PBS acrescido com 0,02% de Tween 20 (Roche) e incubadas com o anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio por 2 horas à temperatura ambiente, com agitação. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes em PBS acrescido com 0,02% de Tween 20 (Roche) e

reveladas por quimioluminescência, utilizando-se o Kit ECL para Detecção de Proteínas (Amersham). As membranas foram expostas a filmes de raios-X (Kodak X omat K) por diferentes períodos de tempo.

3.11. Zimografia de gelatinases

3.11.1. Obtenção das proteínas coletadas no meio de cultura

Para o ensaio de zimografia, as linhagens SK-Mel foram plaqueadas na presença e na ausência de matriz de colágeno tipo I. Após 24 horas, as células foram tratadas com a concentração referente ao IC_{50} das células de melanoma cultivadas sobre equivalente dérmico (1,2 µM) por 48 horas. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado e centrifugado a 3000 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos a 4ºC, para não degradar as proteínas. As proteínas do meio de cultura foram normalizadas através do método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

3.11.2. Mobilidade eletroforética das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina

Para separação das proteínas, utilizou-se gel de SDS-PAGE com 10% de acrilamida e 1% de gelatina, no qual foram colocados 35 µg de proteínas por canal. O gel foi submetido à eletroforese para separação das proteínas.

3.11.3. Incubação e revelação do gel

Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes por 15 minutos com 2,5% Triton X-100, para retirar o SDS. Em seguida, foi lavado 2x por 1 minuto cada com Tampão de Incubação (0,05 M TrisHCl pH 8, 5 mM $CaCl_2$, 5 µM $ZnCl_2$), à temperatura ambiente. O gel foi então incubado com esse mesmo tampão, *overnight*, a 37ºC, para a degradação do substrato pelas metaloproteinases. O gel foi corado com 0,5% Coomasie brilliant blue R-250 por 30 minutos, à temperatura ambiente com agitação, e descorado com Solução Descolorante (metanol 10%, ácido acético 10%). As bandas mais claras, que representavam a degradação, foram comparadas e analisadas conforme os objetivos tratados.

3.12. Avaliação da atividade gelatinolítica

Para o ensaio, a linhagem SK-Mel-103 foi plaqueada na presença e na ausência de substrato. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com a concentração referente ao IC_{50} das células de melanoma cultivadas sobre equivalente dérmico (1,2 µM). Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado e centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos a 4ºC. Após essa etapa, incubou-se este meio com DQ™ gelatina (gelatina conjugada com FITC - Invitrogen) por 6 horas, à temperatura ambiente, no escuro, segundo as orientações do fabricante, a fim de avaliar a atividade das MMPs presentes no meio. A colagenase de *Clostridium* foi utilizada como controle do experimento. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, com comprimento de emissão de 515 nm e de excitação de 495 nm.

3.13. Quantificação de MMP-2 ativa, pelo ensaio de *Biotrak Activity*

Para a quantificação de MMP-2 presente nas condições analisadas, utilizou-se kit de padronização colorimétrico *MMP-2 Biotrak Activity* (Amersham), que corresponde a um sistema colorimétrico que fornece uma determinação quantitativa da forma pró e ativa da enzima, a partir de sobrenadante incubado com substrato fluorescente. O ensaio foi realizado segundo as orientações do fabricante, brevemente descrito a seguir:

Em uma placa de 96 poços revestidos com anticorpos anti-MMP-2, incubou-se o sobrenadante de SK-Mel-103 tratada com a concentração referente ao IC_{50} das células de melanoma cultivadas sobre equivalente dérmico (1,2 µM), assim como uma curva padrão, de concentração conhecida. Após o período de incubação, os poços foram lavados e a forma pró-MMP-2 foi ativada com a incubação com APMA (acetato de p-aminofenilmercúrico). A forma ativa foi detectada sem o tratamento de APMA. Após o tratamento com reagente de detecção, a cor resultante foi lida a 405 nm em espectrofotômetro de microplaca. A concentração de MMP-2 ativa em uma amostra é determinada por interpolação a partir da curva padrão.

3.14. Quantificação de IL-6 e IL-8, por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay)*

Para a quantificação das interleucinas dos tipos 6 e 8 presentes nas condições analisadas, utilizou-se kit de ELISA (R&D Systems), que fornece uma determinação quantitativa de cada interleucina a partir de sobrenadante incubado com anticorpo correspondente. O ensaio foi realizado segundo as orientações do fabricante, brevemente descrito a seguir:

Em uma placa de 96 poços revestidos com anticorpos de captura anti-human IL-6 ou anti-human CXCL8/IL-8, incubou-se *overnight* o sobrenadante das linhagens de melanoma tratadas com a concentração referente ao IC_{50} das células de melanoma cultivadas sobre equivalente dérmico (1,2 µM), assim como uma curva padrão com proteina recombinante de concentração conhecida. Após o período de incubação, os poços foram lavados e bloqueados com solução de BSA (albumina sérica bovina) por 1 hora. As placas foram novamente lavadas e adicionou-se o anticorpo de detecção anti-human IL-6 ou anti-human CXCL8/IL-8, seguido de incubação por 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas e adicionou-se solução de estreptavidina-HRP (*Horse Radish Peroxidase*), com incubação de 20 minutos no escuro. As placas foram lavadas e adicionou-se a solução do substrato, composta de H_2O_2 e tetrametilbenzidina, com incubação de 20 minutos no escuro. Adicionou-se a solução de parada da reação, composta de H_2SO_4, e a densidade ótica foi medida imediatamente, a 405 nm em espectrofotômetro de microplaca. A concentração de interleucina foi determinada por interpolação a partir da curva padrão.

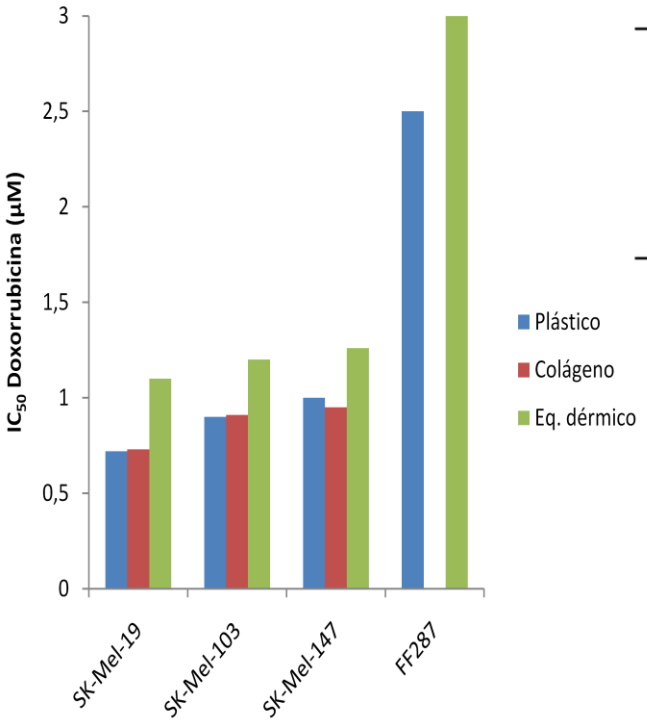
3.15. Análise estatística

Os resultados dos ensaios foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão e analisados estatisticamente, usando o software Graphpad Instat^{TM} (*One-way analysis of variance,* ANOVA), com um valor de significância de $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidade celular

A fim de avaliar o potencial inibitório de doxorrubicina sobre células de melanoma cultivadas sobre diferentes substratos, realizou-se o ensaio de Azul de Tripan sobre as linhagens de melanoma SK-Mel-19, -103 e -147. Todas as células tumorais apresentaram IC_{50} próximos a 1 µM de doxorrubicina em tratamento de 48 horas sobre células cultivadas em equivalente dérmico (fig. 6). As linhagens de melanoma apresentaram maior IC_{50} quando foram cultivadas sobre equivalente dérmico e a linhagem não tumoral de fibroblastos



IC_{50} em 48 horas:

	Plástico	Colágeno	Eq. dérmico
SK-Mel-19	0,72	0,73	1,1
SK-Mel-103	0,9	0,91	1,2
SK-Mel-147	1	0,95	1,26
FF287	2,5	-	3

Figura 6. IC_{50} (µM) de doxorrubicina sobre linhagens celulares cultivadas sobre diferentes substratos, em tratamento de 48 horas.

A figura 7 apresenta a viabilidade e o painel da morfologia das células de melanoma SK-Mel-103 tratadas com o fármaco, comparando-se ao controle não tratado (NT), quando cultivadas sobre diferentes substratos. É possível observar que o substrato é capaz de modular a morfologia e viabilidade das células neoplásicas (fig. 7a). O ensaio de viabilidade celular sobre a linhagem SK-Mel-103 demonstrou que a célula cultivada sobre plástico ou sobre colágeno tipo I apresenta maior sensibilidade ao tratamento ao fármaco, do que quando cultivada sobre equivalente dérmico (fig. 7b), o que foi também semelhante para as outras linhagens de melanoma (fig. 6). Em monocamada, a célula de melanoma apresenta a mesma sensibilidade ao fármaco do que quando cultivada sobre colágeno, com IC_{50} correspondente a 0,9 µM, enquanto que quando cultivada sobre equivalente dérmico, necessita de IC_{50} de 1,2 µM, indicando a necessidade de uma maior concentração de fármaco para inviabilizar 50% das células (figuras 6 e 7b).

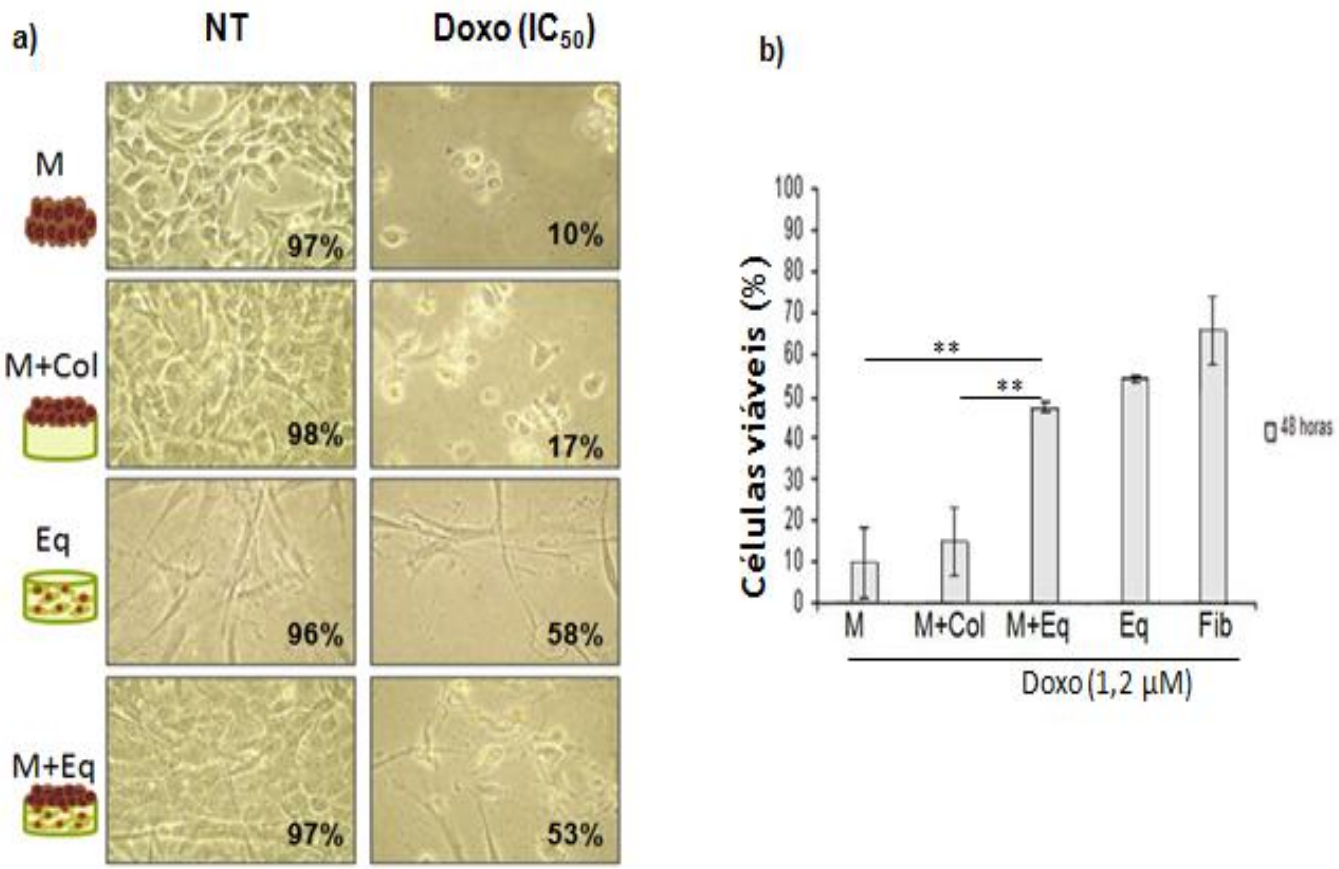


Figura 7. Viabilidade celular da linhagem SK-Mel-103 tratada com doxorrubicina por 48 horas, cultivada sobre diferentes substratos. **(a)** Microscopia óptica da linhagem de melanoma humano SK-Mel-103 quando tratada com doxorrubicina (1,2 µM), sob diferentes condições de cultivo: sobre plástico (M), colágeno (M + Col) ou equivalente dérmico (M + Eq), e equivalente dérmico sem células de melanoma (EQ). Ampliação: 200x. **(b)** Viabilidade (% células viáveis) das condições mencionadas, mais a inibição de doxorrubicina sobre fibroblastos FF287 em monocamada (Fib). (n=3). **p>0,01.

Para avaliar a ação do fármaco sobre a morte celular de linhagens de melanoma cultivadas nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, realizou-se o ensaio de citometria de fluxo para caracterização de morte celular, com incorporação dos fluofóros Anexina V-FITC e iodeto de propídio, que são lidos nos comprimentos de onda para FITC e Perc-P, respectivamente. Na figura 8, é possível verificar que há diminuição de marcação com fluofóforo nas células de SK-Mel-103 cultivadas sobre equivalente dérmico, indicando uma menor porcentagem de morte celular (apoptose ou necrose) quando o melanoma é cultivado sobre equivalente dérmico (fig.8).

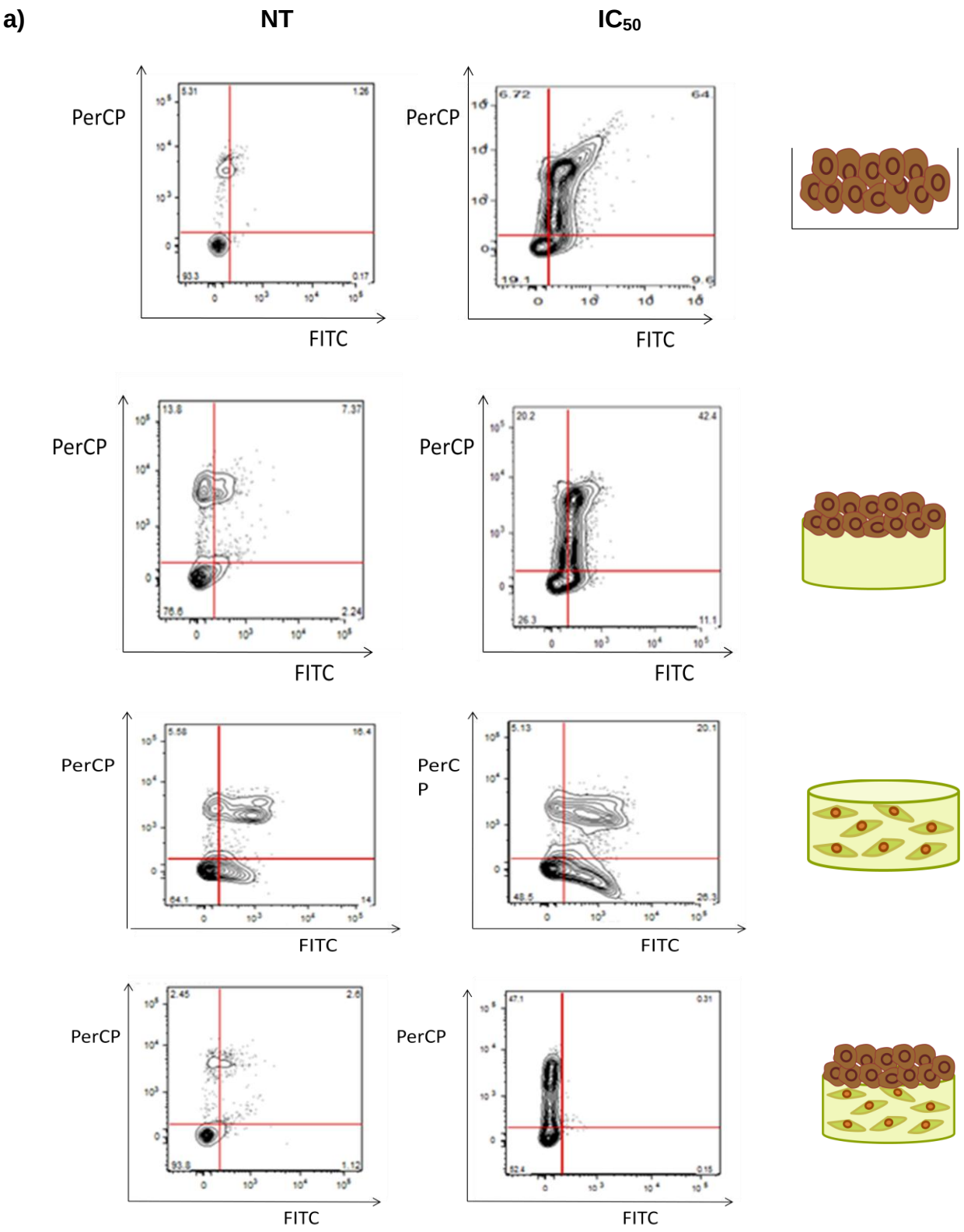


Figura 8a. Caracterização tipo de morte celular de células de melanoma metastático humano SK-Mel-103 cultivadas em monocada (M) sobre colágeno tipo I (M+Col) ou sobre equivalente dérmico (M+Eq), e ainda o controle do equivalente dérmico (Eq) sem células de melanoma, não tratados (NT) ou tratados com 1,2 µM de doxorrubicina por 48 horas (IC_{50}).

b)

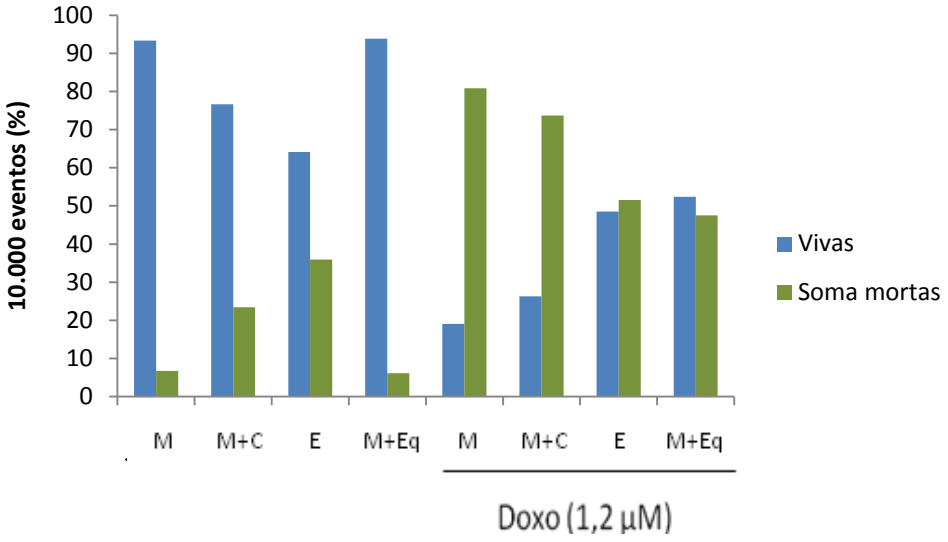


Figura 8b. Dados plotados da figura **8a**, referente à porcentagem de células em 10.000 eventos não marcados (vivas) e a somatória das duplo-marcadas ou marcadas apenas para um fluoróforo (mortas).

Para avaliar se a inibição da viabilidade provocada pelo fármaco era seletiva para linhagens de melanoma, realizou-se o ensaio de fragmentação de DNA por citometria de fluxo, utilizando-se células de melanoma transfectadas com vetor contendo GFP. Conforme desenho experimental, as células de melanoma viáveis apresentariam marcação $FITC^+$ e, quando a membrana estivesse fragmentada, apresentariam marcação dupla $FITC^+/IP^+$. Para os fibroblastos, se estivessem viáveis, não apresentariam incorporação de fluofóro e quando a membrana estivesse fragmentada, haveria marcação IP^+ apenas. Desta forma, seria possível diferenciar a população de melanoma da cultura de fibroblastos, quando houvesse cocultivo.

Como verificado na figura 9, observa-se, que nas células SK-Mel-103 cultivadas sobre equivalente dérmico, há maior porcentagem de células duplo-marcadas (referentes à célula de melanoma GFP com incorporação de iodeto de propídeo), em comparação às células marcadas apenas com iodeto de propídeo (referente aos fibroblastos ou células de melanoma sem GFP). A eficiência de transfecção das células de melanoma foi de 80%.

Portanto, no equivalente dérmico, há uma menor porcentagem de morte celular na linhagem de melanoma, quando comparada às outras condições de cultivo (fig. 9b). Observa-se que o fibroblasto é resistente ao tratamento com o fármaco e que sua presença diminui a morte de células de melanoma (duplo-marcadas, fig. 9b).

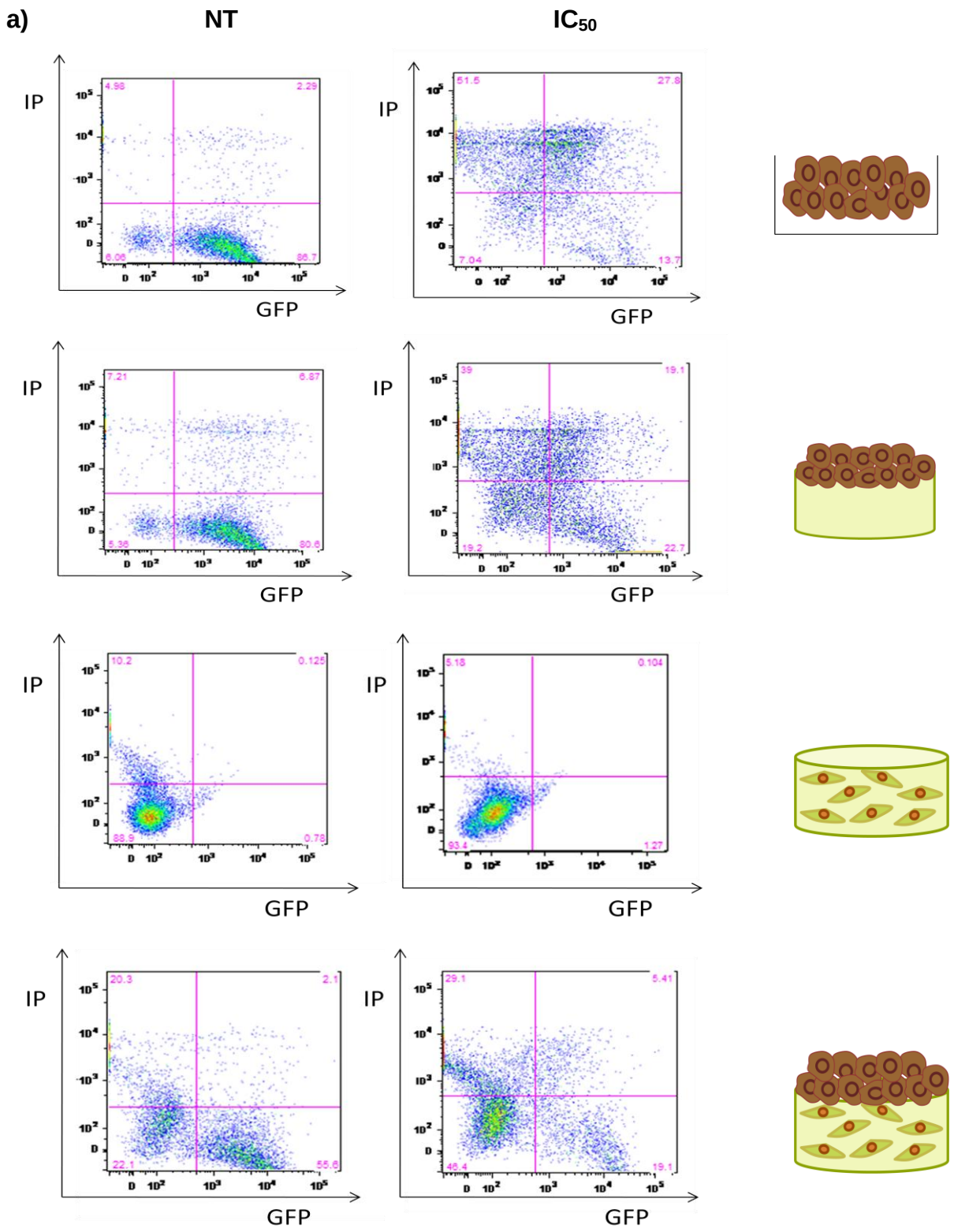


Figura 9a. Caracterização de morte celular seletiva de células de melanoma metastático humano SK-Mel-103 cultivadas em monocada (M), sobre colágeno tipo I (M+Col) ou sobre euqivalente dérmico (M+Eq), e ainda o controle do equivalente dérmico (Eq) sem células de melanoma, não tratados (NT) ou tratados com 1,2 µM de doxorrubicina por 48 horas (IC_{50}).

b)

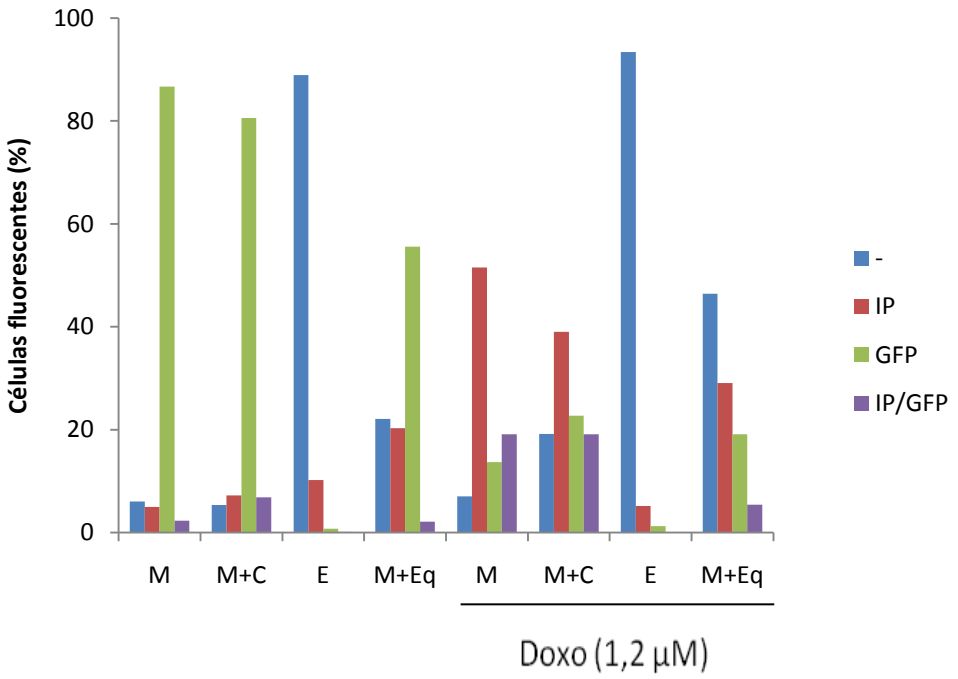


Figura 9b. Dados plotados da figura **9a**, referente à porcentagem de células fluorescentes em 10.000 eventos, apresentando dupla marcação (IP/GFP), marcadas só com GFP, só com iodeto de propídeo (IP) ou não marcadas (-).

4.2. Indução de mecanismos de morte celular

A fim de testar o papel do microambiente na indução de morte celular dependente de p53 e caspases 3 e 9, induzidas conhecidamente pelo tratamento com doxorrubicina em melanoma (GERNER et al., 1975; GRUBER et al., 2001), avaliou-se a expressão dessas proteínas por Western Blot.

Na figura 10, observa-se que na presença de doxorrubicina há menor expressão de p53 quando as linhagens de melanoma foram cultivadas sobre equivalente dérmico, quando tratadas com doxorrubicina (1,2 µM). Observa-se também que a não clivagem das caspases 3 e 9, nas mesmas condições acima, indicando a não ativação da via de apoptose. O equivalente dérmico também não apresentou clivagem dessas caspases. Como controle, utilizou-se a expressão da proteína constitutiva β-actina.

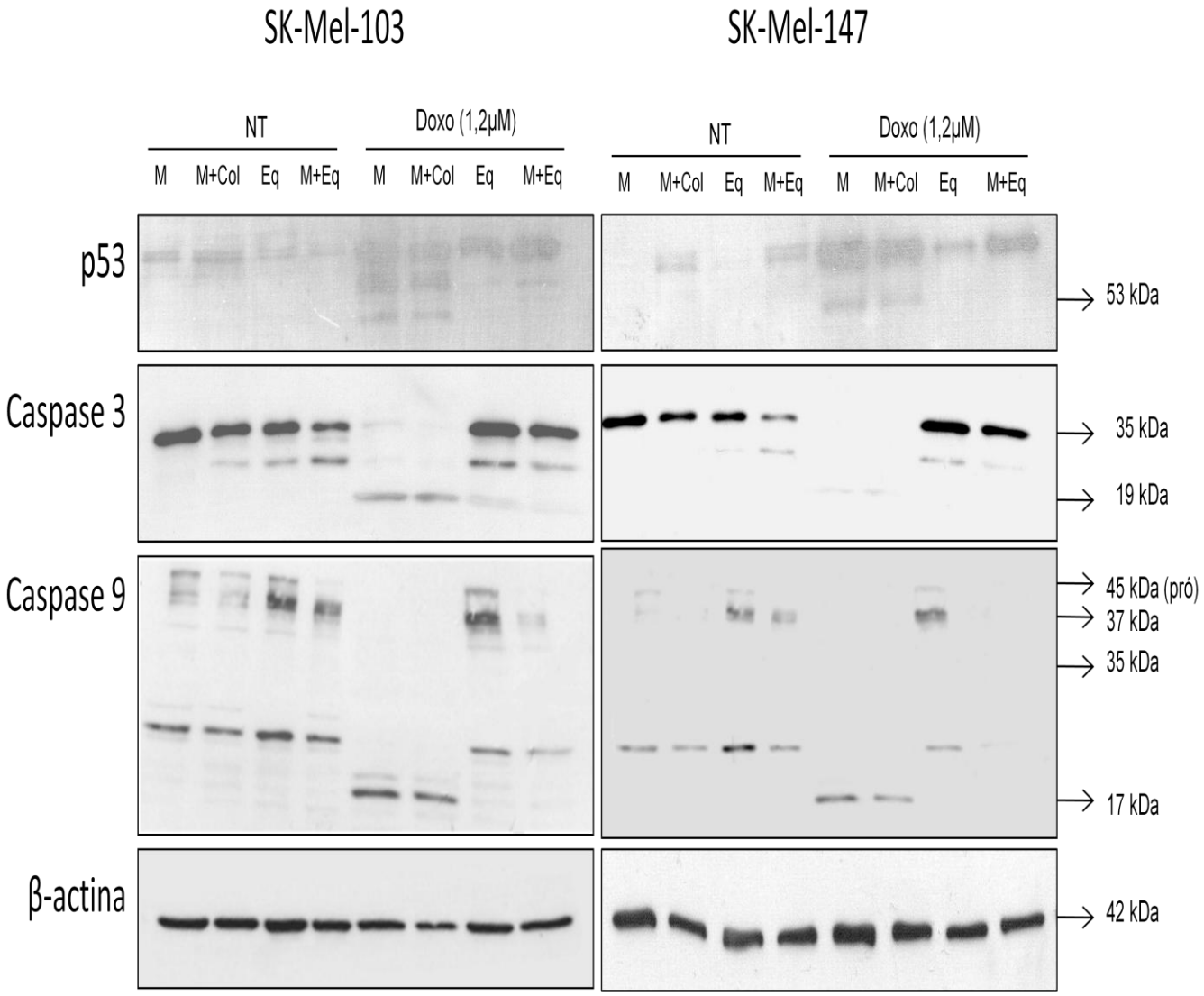


Figura 10. Perfil de p53 e caspases 3 e 9, moduladas pelo tratamento com doxorrubicina para as linhagens de melanoma SK-Mel-103 e -147.

4.3. Inibição de metaproteinases

Para identificar a modulação de MMPs pelo tratamento com a doxorubicina nas diferentes condições de cultivo, utilizou-se o ensaio de zimografia, que permite avaliar a atividade de gelatinases pela digestão de gelatina.

Conforme observado na figura 11, a presença de matriz estimula a atividade das MMPs, verificadas em duas das três linhagens testadas (SK-Mel-103 e -147). Na mesma figura, nota-se que não há variação de MMP-9 ativa nas diferentes condições de tratamento.

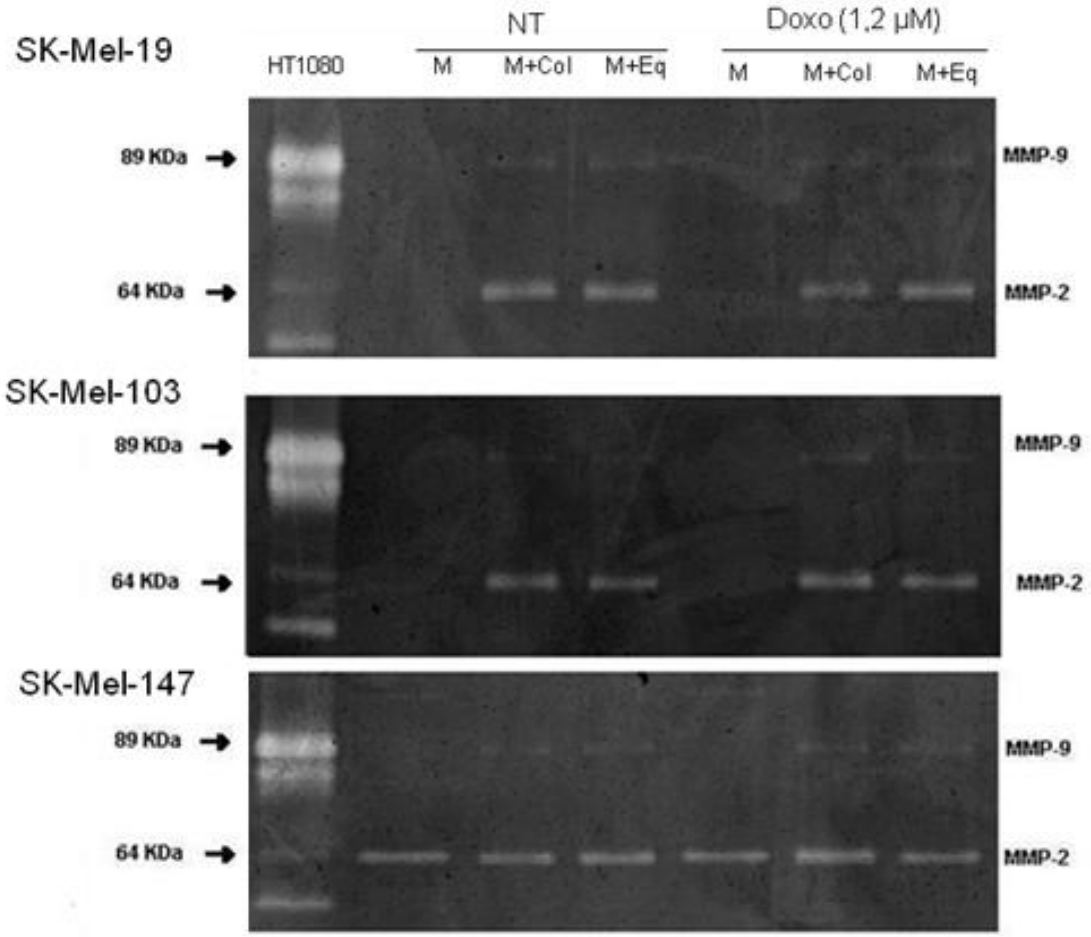


Figura 11. Zimografia da atividade de gelatinases (MMPs 2 e 9) presentes em meio de cultivo das linhagens de melanoma metastático humano SK-Mel, plaqueadas sobre diferentes substratos: sobre plástico (M), sobre colágeno (M+Col) ou sobre equivalente dérmico (M+Eq), não tratadas (NT) ou tratadas com doxorrubicina (1,2 µM) por 48 horas. O sobrenadante de fibrossarcoma HT1080 foi utilizado como controle do experimento.

Para avaliar com maior precisão se a presença de equivalente dérmico seria capaz de modular diferencialmente a atividade de MMPs, em resposta ao tratamento com o fármaco, foram realizados outros dois ensaios mais sensíveis, como o ensaio de atividade gelatinolítica por incubação de meio condicionado com DQ^{TM} gelatina e quantificação de MMP-2 ativa através de *Biotrak Activity* (figs. 12 e 13, respectivamente).

Como observado nas figuras 12 e 13, a linhagem de melanoma SK-Mel-103, na presença de equivalente dérmico, apresenta maior atividade de MMP, quando comparado às outras condições de cultivo, tratadas com o fármaco. Na figura 13, especificamente, observa-se o aumento de MMP-2 na presença de equivalente dérmico.

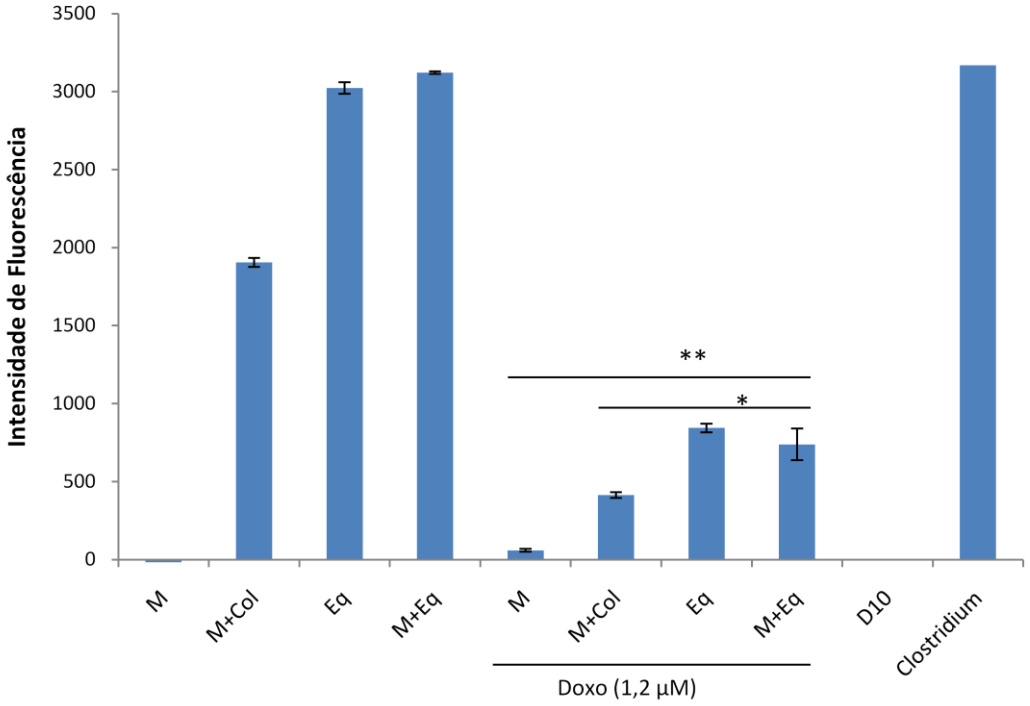


Figura 12. Atividade gelatinolítica de meio de condicionado de células de melanoma SK-Mel-103 em diferentes condições de cultivo (melanoma em monocamada – M, melanoma sobre colágeno – M+Col, melanoma sobre equivalente dérmico – M+Eq, além do controle de equivalente dérmico sem células de melanoma – Eq), na ausência ou presença de tratamento com doxorrubicina (48 horas), mostrada como média da intensidade de absorbância (A_{515}) ± desvio padrão (barras): *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ (n=2). A enzima de *Clostridium* foi utilizada como controle do experimento. D10: DMEM+10%SFB.

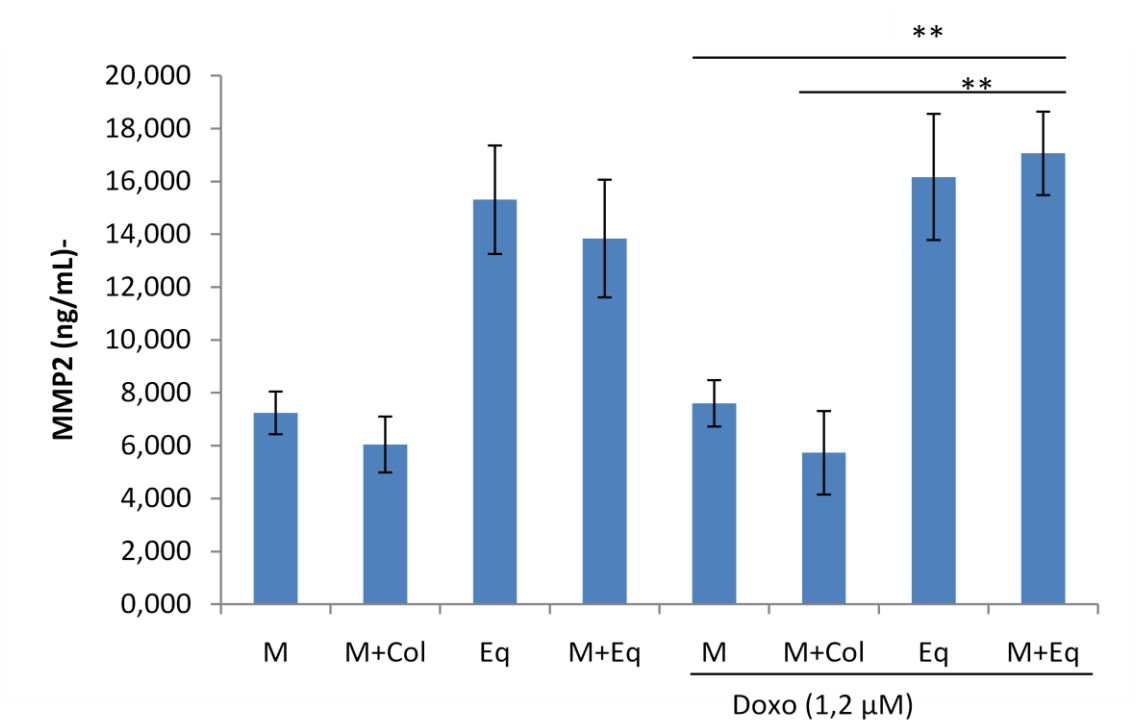


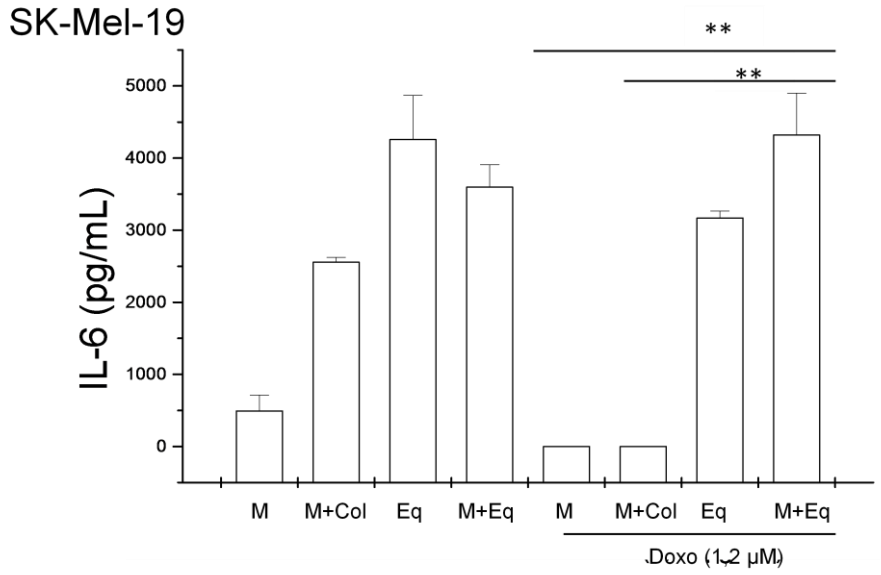
Figura 13. Quantificação de MMP-2 ativa presente em meio de células de melanoma SK-Mel-103 em diferentes condições de cultivo, na ausência ou presença de tratamento com doxorrubicina (48 horas). Mostrada como média da intensidade de absorbância (A_{515}) ± desvio padrão (barras): n=5.

4.4. Modulação de interleucinas pró-tumorais

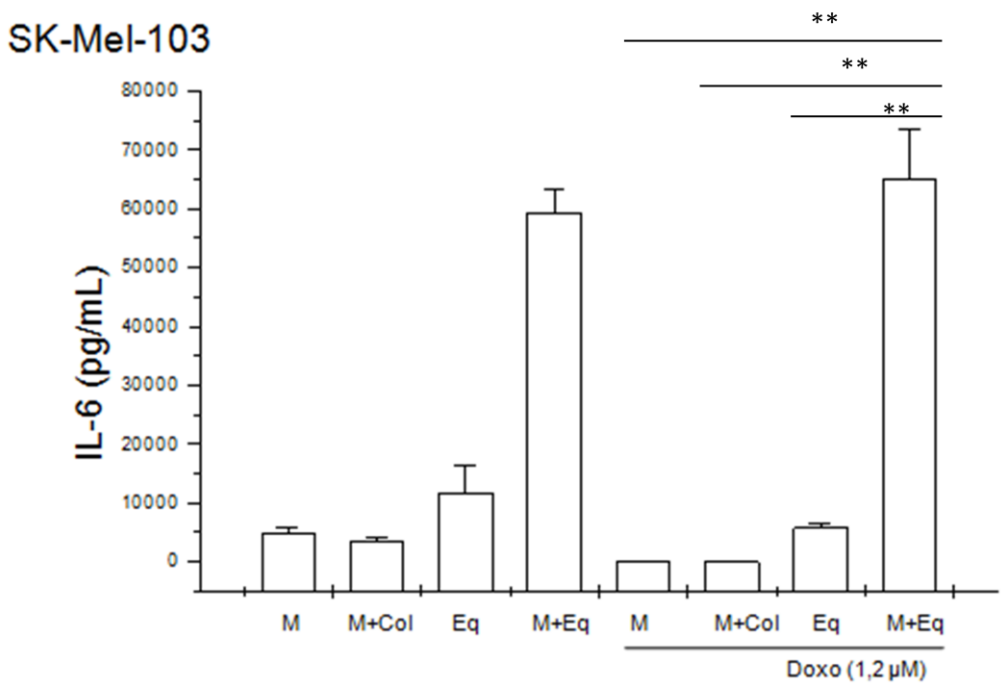
A fim de avaliar o papel do microambiente na modulação de citocinas importantes para a promoção do melanoma, avaliou-se o papel da presença ou ausência do microambiente juntamente com as células tumorais tratadas com doxorrubicina, na indução das interleucinas dos tipos 6 e 8, através de ensaios de ELISA.

Conforme verificado na fig. 14, as linhagens de melanoma apresentam maior indução de IL-6 quando estão na presença de equivalente dérmico, quando comparado às outras condições de cultura tratadas com o fármaco. Interessantemente, as linhagens SK-Mel-103 e -147 apresentam maior expressão de IL-6 do que o equivalente dérmico sem melanoma (figs. 14b e 14c).

a)



b)



Figuras 14a e 14b. Quantificação de IL-6 secretada por células de melanoma em diferentes condições de cultivo, na ausência ou presença de tratamento com doxorrubicina (48 horas). Para SK-Mel-19, n=3; para SK-Mel-103, n=5.**p>0,01.

c)

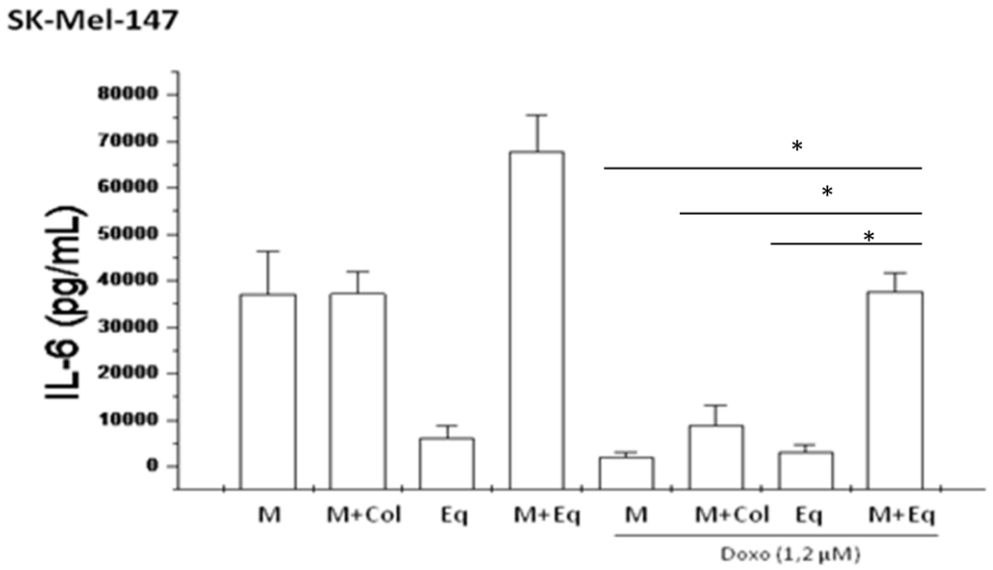
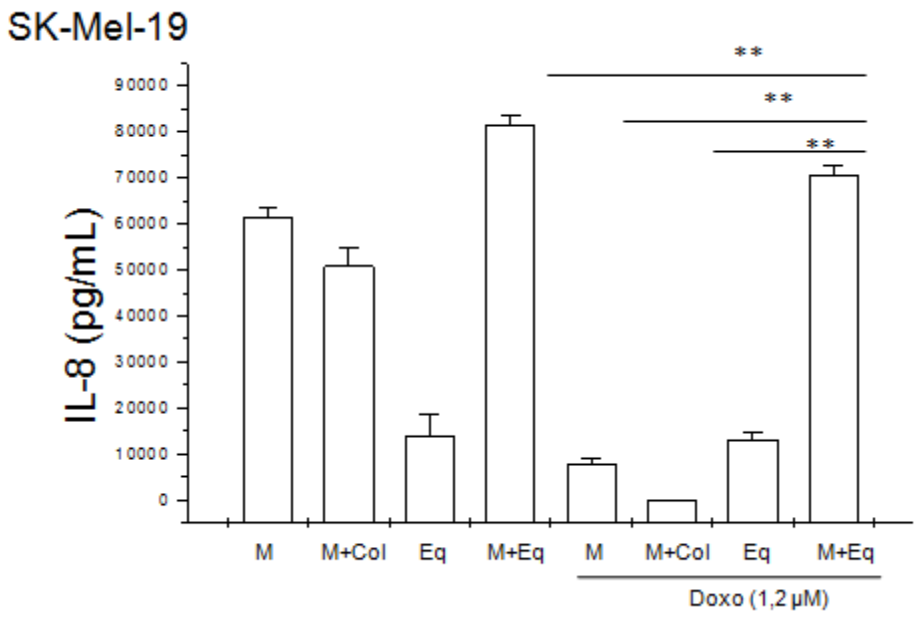


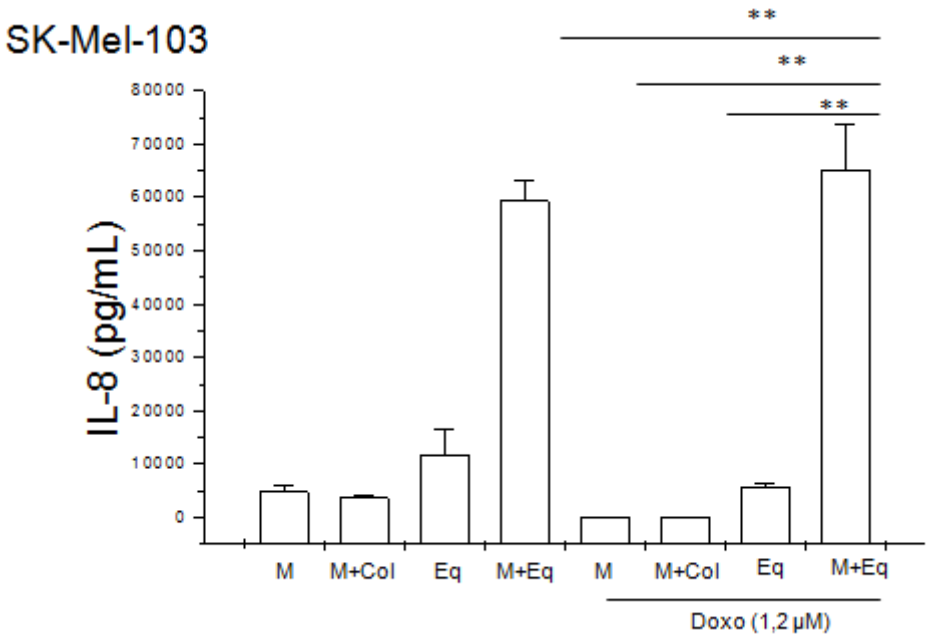
Figura 14c. Quantificação de IL-6 secretada por células de melanoma em diferentes condições de cultivo, na ausência ou presença de tratamento com doxorrubicina (48 horas). Para SK-Mel-147, n=5.*p>0,05.

Quanto à indução de IL-8, conforme observado na fig. 15, as linhagens de melanoma também apresentam maior indução de IL-8 quando estão na presença de equivalente dérmico, quando comparado às outras condições de cultura tratadas com o fármaco. Todas as linhagens de melanoma apresentaram maior expressão de IL-8 do que o equivalente dérmico sem melanoma.

a)



b)



Figuras 15a e 15b. Quantificação de IL-8 secretada por células de melanoma em diferentes condições de cultivo, na ausência ou presença de tratamento com doxorrubicina (48 horas). Para SK-Mel-19, n=3; para SK-Mel-103, n=5.**p>0,01.

c)

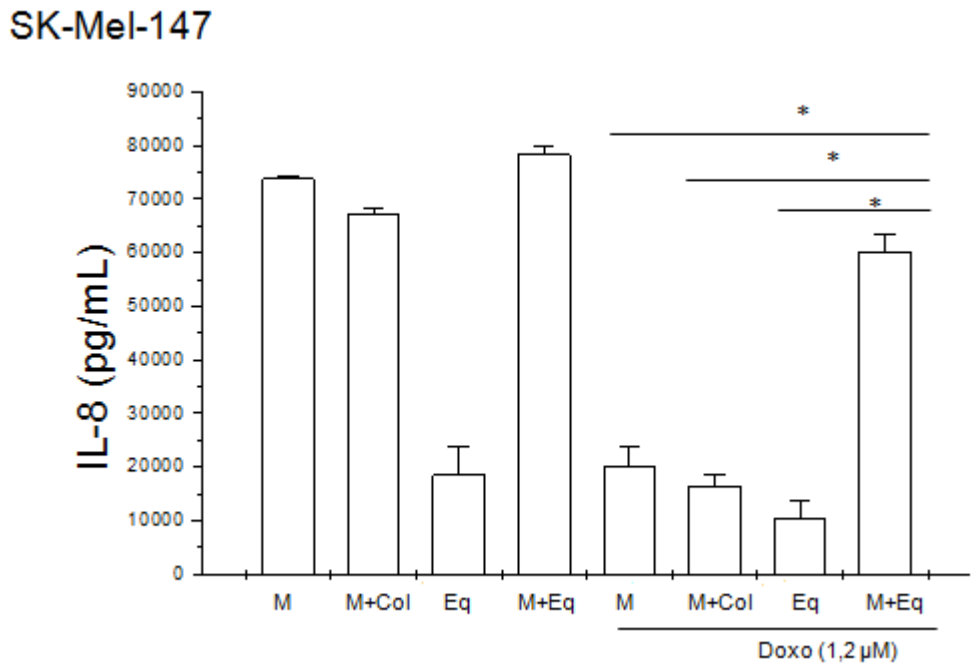


Figura 15c. Quantificação de IL-8 secretada por células de melanoma em diferentes condições de cultivo, na ausência ou presença de tratamento com doxorrubicina (48 horas). Para SK-Mel-147, n=5.*p>0,05.

4.5. Invasão em ambiente biomimético

Para avaliar a invasão de células de melanoma em colágeno tipo I, com a ausência ou presença de fibroblastos, principal constituinte do estroma, células de melanoma metastático humano foram plaqueadas sobre colágeno tipo I ou equivalente dérmico e a invasão foi avaliada no período de 30 dias, com coletas a cada 5 dias (figura 16a).

a)

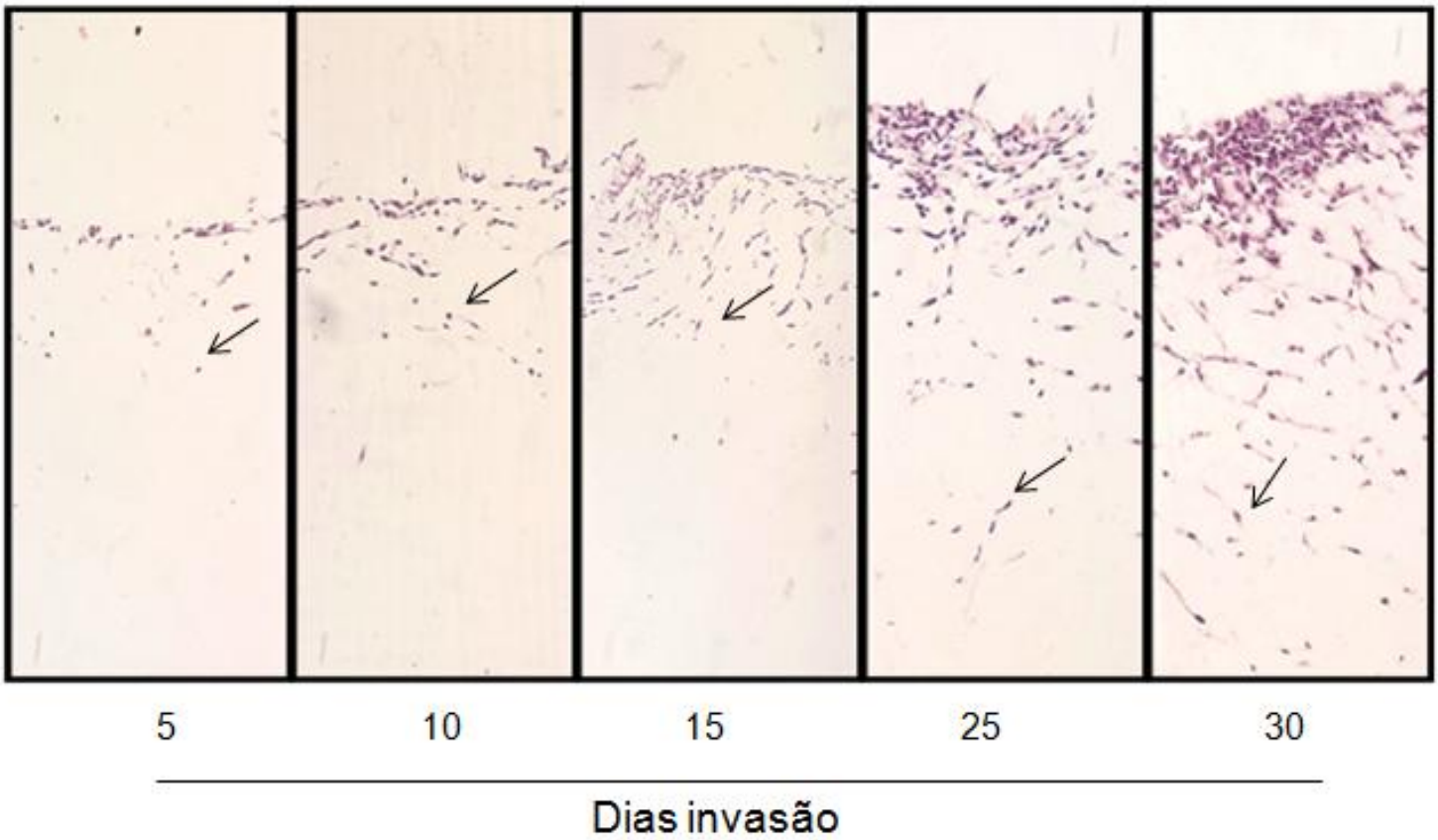


Figura 16a. Fotomicrografia da progressão da invasão de células de melanoma metastático humano em colágeno tipo I. As setas indicam focos de invasão. Aumento: 200x.

b)

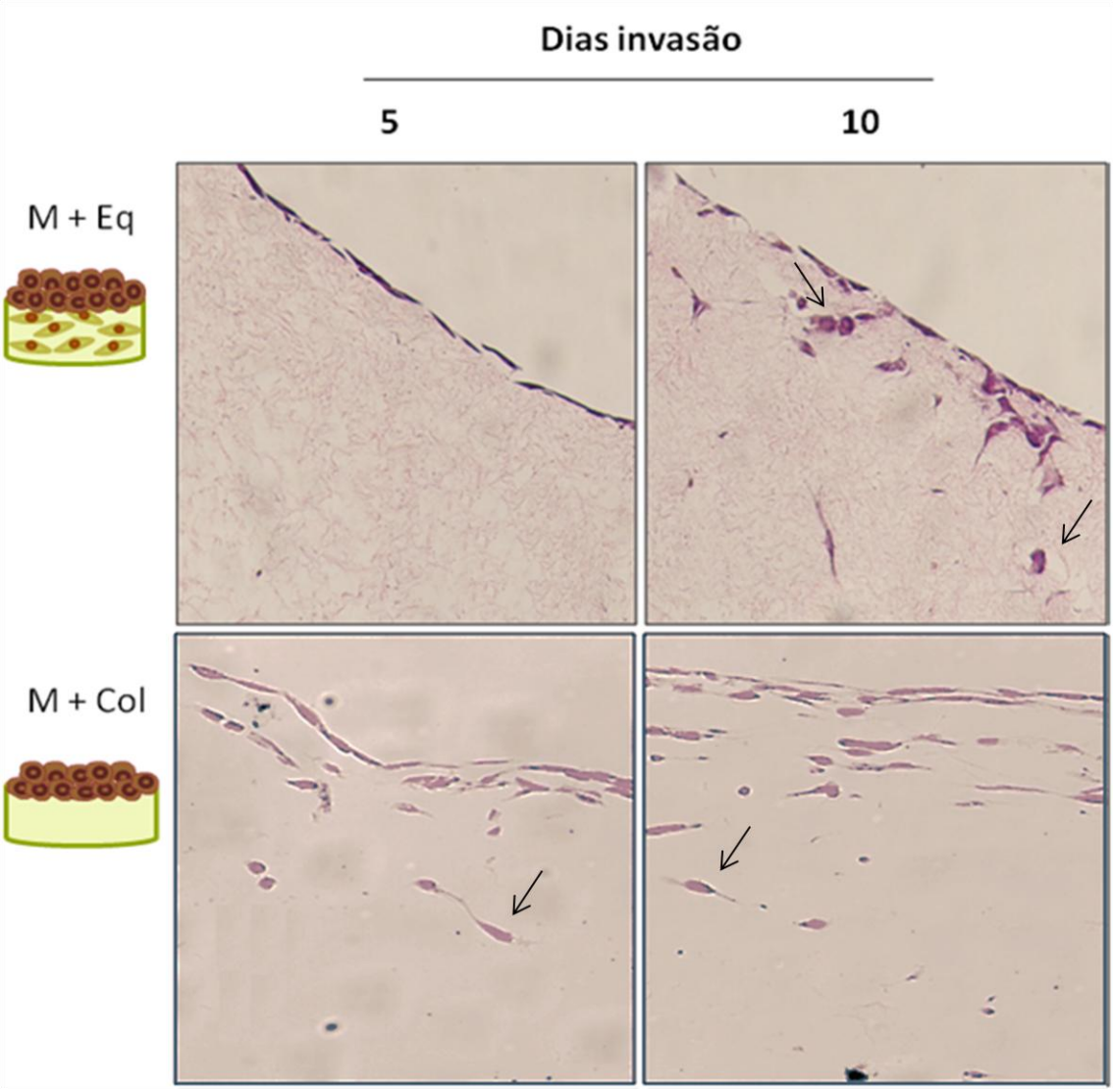


Figura 16b: Fotomicrografia da progressão da invasão de células de melanoma metastático humano em ambiente biomimético, comparando-se a invasão em colágeno tipo I com a que ocorre em equivalente dérmico. As setas indicam focos de invasão. Aumento: 400x.

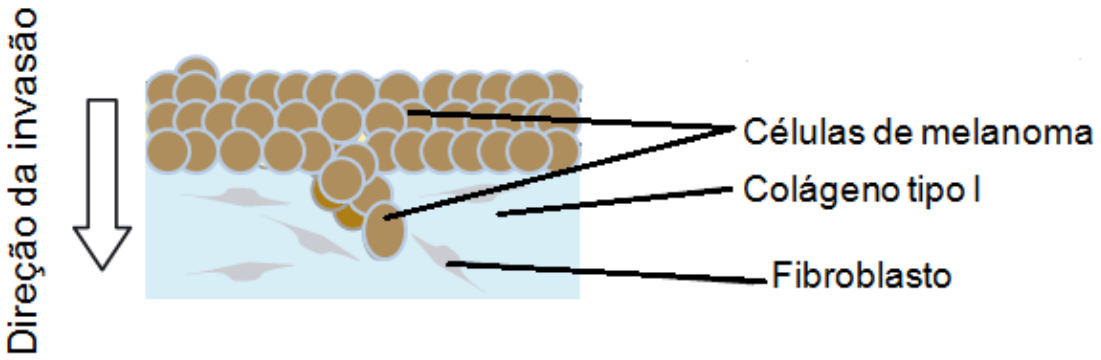


Figura 17. Esquema da invasão verticalizada de células de melanoma plaqueadas sobre equivalente dérmico. Adaptação de Gagglioli e Sahai (2007).

Como exemplificado na fig. 16a, a partir do 5°dia de invasão, há o estabelecimento do crescimento, com invasão verticalizada para o interior do colágeno (conforme esquema da fig. 17). Na fig.16b, é possível observar que a proliferação e a invasão são mais pronunciadas em colágeno I, comparando-se com a invasão em equivalente dérmico.

5. DISCUSSÃO

5.1. Equivalente dérmico protege as células de melanoma contra o efeito citotóxico de doxorrubicina

Culturas celulares em monocamadas não refletem as mudanças que ocorrem nos estágios iniciais de progressão tumoral, nem mesmo a morfologia e expressão de genes relacionados ao crescimento, migração e invasão de melanócitos normais, células de *nevus* ou células de melanomas.

A utilização de culturas organotípicas, como pele humana artificial, retrata com fidelidade as interações célula-matriz e célula-célula entre diferentes tipos celulares, tão importantes no processo de desenvolvimento do tumor (BERKING & HERLYN, 2001). Igualmente importante é o cultivo de células tumorais em equivalente dérmico, a fim de avaliar com maior fidelidade os processos que ocorrem entre a célula neoplásica e o estroma (KATAOKA et al., 2010).

Sendo assim, avaliou-se o papel do microambiente sobre linhagens de melanoma metastático humano quando cultivadas, comparativamente, sobre plástico, colágeno tipo I ou ainda equivalente dérmico.

As células de melanoma apresentaram perfil muito semelhante quanto à sensibilidade ao fármaco. Os ensaios de viabilidade celular sobre a linhagem SK-Mel-103 demonstram que para a célula em monocamada, ou seja, cultivada sobre plástico, o IC_{50} corresponde a 0,9 µM, enquanto que para células cultivadas sobre equivalente dérmico, 1,2 µM, indicando a necessidade de uma maior concentração de fármaco para inviabilizar 50% das células. Estabelecemos que o IC_{50} da SK-Mel-103 seria a concentração de escolha para todos os ensaios seguintes, pois este era muito similar para todas as linhagens de melanoma analisadas. Estudos recentes mostram uma íntima interação entre fibroblastos e melanomas, com microambiente favorável à invasão tumoral (NTAYI et al*.,* 2003).

Foi observado também que o perfil morfológico das linhagens tumorais, exemplificado pela linhagem de melanoma SK-Mel-103, apresentou diferença quanto aos diferentes substratos.

No presente estudo, observa-se que a citotoxicidade da doxorrubicina foi maior em plástico, alcançando 75% de morte celular, quando comparada ao cultivo sobre colágeno onde se observou 67% de morte celular. No ambiente biomimético, interessantemente observou-se apenas 17% de morte celular das células contadas em conjunto (melanoma e fibroblastos).

A proteção da viabilidade das células tumorais na presença de equivalente dérmico é confirmada através dos ensaios de citometria de fluxo, nos quais se constata que há uma diminuição de morte nas células de SK-Mel-103, seja por apoptose ou necrose, cultivadas na presença de equivalente dérmico. Nesta mesma condição, não há a indução significativa de morte em fibroblastos, devido à resistência deste ao tratamento com doxorrubicina, o que é constatado principalmente pela diferenciação das populações quando as células são cocultivadas.

A presença do fibroblasto, e não somente da matriz extracelular, é importante para a proteção de morte celular induzida pela doxorrubicina. Muitos estudos consideram apenas a matriz como o fator predominante para a simulação do ambiente tumoral, porém a presença de células do estroma é essencial para a reconstrução fidedigna dos processos que envolvem a promoção da neoplasia (ALT-HOLLAND et al., 2008; RÄSÄNEN & VAHERI, 2010). O microambiente favorece o crescimento tumoral, proporcionando às condições necessárias para o crescimento e progressão do tumor, além de protegê-lo de morte celular (AHMED et al., 2008).

5.2. Morte celular em células de melanomas tratadas com doxorrubicina é inibida na presença de equivalente dérmico

Diferentemente de outros tipos de câncer, os melanomas apresentam maior resistência a agentes quimioterápicos, pois essas células sofrem mudanças na expressão de certos genes durante a transformação maligna (CURTIN et al, 2005; CHIN et al, 2006). Tais alterações são observadas especificamente no gene p53, que se encontra mutado na maioria dos tumores, e assim não apresentam a via de apoptose ativada, resistindo à morte celular. Em melanomas, o gene p53 é selvagem (*wild type*), isto é, não mutado, porém ainda assim as células tumorais escapam da morte celular. Soengas e Lowe

(2003) discutem que a extrema resistência dos melanomas a quimoterápicos e que os baixos índices de apoptose, particularmente em estágios avançados da doença, revelam que a morte celular é evitada contundentemente devido a 3 tipos de alterações moleculares como i) a ativação dos fatores antiapoptóticos, ii) inativação de fatores antiapoptóticos e iii) reforço das vias de sobrevivência celular (STAUNTON & GAFFNEY, 1995; GLINSKY et al., 1997). Desta forma, as células tumorais resistentes impedem a identificação de certos fatores prognósticos ou como predizer a resposta ao fármaco (SERRONE et al, 2000; SOENGAS et al, 2001).

Embora a doxorrubicina seja capaz de induzir apoptose em células de melanoma *in vitro*, sua indução de morte celular programada dia p53 e caspases 3 e 9 é diminuída na quando as células de melanoma estão na presença de equivalente dérmico, indicando que indução de morte celular foi reprimida pra presença do estroma. O equivalente dérmico também não apresentou clivagem das caspases, pois em fibroblastos tratados com doxorrubicina não há ativação de morte, mas parada em ciclo celular (SIU et al., 1999).

Além da resistência intrínseca dos melanomas, é possível verificar que a presença do microambiente mostra-se importante na expressão de proteínas envolvidas para a indução de morte celular induzida pela doxorrubicina. A literatura relata que células do microambiente, como fibroblastos, podem auxiliar a propagação de melanoma, aumentando a quimiorresistencia das células neoplásicas a fármacos antitumorais, através da secreção de fatores de crescimento, MMPs e citocinas, que favorecem o crescimento do tumor e o induzem a produzir proteínas que evadem os mecanismos de morte celular (BURDELYA et al., 2006; RÄSÄNEN & VAHERI, 2010).

5.3. Indução de metaproteinases aumenta na presença de euqivalente dérmico

Os melanomas representam um dos tumores sólidos melhor caracterizados pela sua capacidade de invasão e metástase. O problema dos tumores sólidos está justamente na sua alta capacidade metastática, principal causa de morte dos pacientes com câncer (HOFMANN et al, 2005). A metástase está envolvida em processo de invasão mediado por MMPs.

Para identificar se as MMPs estavam ativadas na presença do microambiente, utilizou-se o ensaio de zimografia. Como evidenciado pelo ensaio, a presença de matriz já é necessária para que ocorra a atividade de gelatinases, em duas das três linhagens testadas. A linhagem SK-Mel-147 apresentou a atividade de gelatinases em todas as condições, tratadas ou não com o fármaco, devido à sua alta capacidade invasiva. A literatura comprova que a presença de substrato é essencial para estimular a atividade dessas MMPs (HOFMANN et al., 1999; SINGER et al., 2002; LA ROCCA et al., 2004).

Ntayi e colaboradores (2003) demonstraram que o nível de MMP-2 não é alterado quando são cultivados melanomas e fibroblastos isolados fisicamente, enquanto a expressão da MMP-2 aumenta quando feita co-cultura dos mesmos, mostrando um maior nível de MMP-2 ativa quando melanoma é cultivado em contato com equivalente dérmico (fibroblasto em colágeno). Nossos resultados estão de acordo com tais autores, pois, embora eles não tenham recriado o ambiente tridimensional côo apresentado aqui, também observamos uma maior atividade de MMP-2 quando as células de melanoma estão na presença do equivalente dérmico.

Não foi observado neste trabalho variação da quantidade de MMP-9 ativa nas diferentes condições de tratamento. Spallarossa e colaboradores (2005) demonstraram que há um aumento da quantidade de MMP-9 pela via de MAP-kinase em células cardíacas quando tratadas com doxorrubicina, no ambiente bidimensional. Os resultados obtidos aqui diferem, indicando que em melanoma outras vias devam interagir para impedir a ativação de MMP-9. Hofmann e colaboradores (2005) descrevem como as principais MMPs presentes no processo de progressão e invasão tumoral de melanomas: MMP-

1, -2, -9, -13, e MT1-MMP e seus inibidores teciduais TIMP-1, -2 e -3. A expressão dessas enzimas está aumentada em estágios avançados do melanoma com exceção a MMP-9, cuja expressão está limitada aos estágios iniciais da progressão, diminuindo com a evolução tumoral, justificando o fato dessa enzima ter sido identificada com pouca atividade, pois as culturas foram inicialmente isoladas de melanoma mestástático, fase avançada da progressão tumoral.

5.4. Equivalente dérmico estimula células de melanoma a expressarem interleucinas pró-tumorais

As células de melanoma expressam uma variedade de citocinas, quimiocinas e seus receptores, e o nível de expressão sofre alterações com a progressão de melanoma (RICHMOND et al., 2009). Moretti et al. demonstraram que *nevus* e melanomas primários delgados (<1 mm) expressam baixas quantidades de fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), fator de crescimento tumoral beta (TGF-β) e seu receptor, interleucina 8 (IL-8) e c-kit. Melanomas em metástase apresentaram padrões similares de expressão, exceto para o fator de células-tronco (SCF).

As células de melanoma expressam fatores de crescimento autócrinos, como fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), atividade estimulatória de crescimento de melanoma (MGSA/GRO), IL-8 e, por vezes, IL-6, subunidade A do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-A) e IL-10, que estimulam a proliferação das células tumorais; e parácrinos, como os fatores de crescimento PDGF, fator de crescimento epidérmico (EGF), TGF-β, IL-1, fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), fator de crescimento do nervo (NGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que modulam o microambiente em benefício à invasão e crescimento tumoral (MATTEI et al., 1994).

Segundo Melnikova e Bar-Eli. (2009), a expressão de IL-6 e IL-8 são associadas biologicamente à malignidade precoce, enquanto que TGF-β, GM-

CSF e IL-1α são altamente expressos em lesões tardias, com TGF-β sendo marcador de disseminação metastática (MORETTI et al., 1999).

Neste trabalho foi observado a superexpressão de interleucinas na presença do equivalente dérmico, comprovando-se que o microambiente é capaz de modular a promoção do melanoma.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com inúmeras atividades biológicas. É produzido por componentes normais da pele, incluindo células epidérmicas, fibroblastos dérmicos e células endoteliais (PAQUET & PIÉRARD, 1996). Em muitos trabalhos, a presença desta citocina foi associada com malignidade celular, sendo uma candidata a marcador de prognóstico para melanoma (MOLNAR et al., 2000). Foi observado uma maior expressão dessa citocina nas linhagens SK-Mel-103 e -147, que são as mais invasivas, quando comparadas com a SK-Mel-19.

A IL-8 é uma citocina multifuncional autócrina importante para a modulação e proliferação das células de melanoma, pois sua superexpressão estimula a migração dessas células através da indução de MMPs e angiogênese, eventos críticos para o crescimento e metástase desse tumor. Além disso, a sua expressão no tecido tumoral sugere uma associação entre a expressão dessa citocina e a agressividade do tumor. É produzida majoritariamente pelas células tumorais (RICHMOND, 1991; PAYNES & CORNELIUS, 2002). Aqui, foi observado que as células de melanoma, quando cultivadas juntamente com equivalente dérmico, produzem mais IL-8 do que em outras condições de cultivo, sugerindo que é necessária a interação da célula de melanoma com o estroma para que esta possa superexpressar essa citocina.

5.5. Invasão tumoral é gradual em equivalente dérmico

Estudos que explorem o efeito de fármacos em ambientes biomiméticos *in vitro* podem auxiliar o estabelecimento da ação do quimioterápico sobre as células tumorais, de forma mais próxima ao que ocorre *in vivo*, considerando os elementos do microambiente tumoral. Portanto, padronizar a invasão de linhagens de melanoma metastático humano em uma matriz de colágeno tipo I, povoada ou não com fibroblastos, mimetizando o microambiente dérmico, é essencial para posterior avaliação da ação de fármacos na terapia antineoplásica.

O colágeno tipo I é o principal constituinte da derme e, no processo de invasão celular, seu remodelamento ocorre por ação enzimática de metaloproteinases, que representam uma família de mais de vinte endopeptidases, sintetizadas pelas células tumorais ou por células do estroma (WESTERMARCK &, KAHARI, 1999; BORNSTEIN & SAGE, 2002). Neste trabalho observou-se que a invasão tumoral seja gradual, em função do tempo, conforme o crescimento é estabelecido no colágeno. A partir do 15° dia, o processo de invasão já é proeminente e já é possível identificar um grande número de células que migraram para o interior do substrato. Entre os dias 25 e 30, as células começam a migrar em pequenos blocos e há um aumento de proliferação significativo na superfície do colágeno.

O crescimento tumoral resulta de um desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose, enquanto o potencial invasivo é influenciado por alterações na interação célula-célula e célula-matriz. Segundo a literatura, *in vitro*, a presença de substrato pode estimular a proliferação e, sobretudo, a invasão de células tumorais, pelo fato dessa estrutura conter componentes potencialmente antiadesivos e moduladores de adesão, proliferação e migração celular (LIOTTA, 1986; HOTARY et al., 2000; CURRAN & MURRAY, 2002; NABESHIMA et al., 2002).

Com o progresso da invasão, o colágeno foi remodelado pelas MMPs, possivelmente liberando sítios crípticos, que poderiam estimular uma maior secreção dessas enzimas, contribuindo ainda mais para o processo invasivo. Além disso, esses sítios, assim como a presença de células estromais,

poderiam estimular a produção de interleucinas que favorecem a progressão tumoral, como a IL-8, que já foi visto que se encontra aumentada neste modelo. Como essa citocina favorece a migração e invasão celular, através, dentre outros fatores, de indução de MMP-2, também exacerbada no modelo, iniciando novamente o ciclo que favorece o desenvolvimento do tumor.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que a presença do estroma contribui favoravelmente para a promoção do melanoma e resistência a fármacos, sendo este essencial para o aprimoramento de ensaios pré-clínicos, melhorando, desta forma, os testes *in vitro* para prospecção de novos fármacos antitumorais.

CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINEOPLÁSICO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO SOBRE LINHAGENS DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antioxidantes e câncer

Compostos antioxidantes são encontrados em diversas espécies vegetais (CAPANOGLU et al., 2008). Muitos estudos comprovam a eficácia da utilização desses compostos no tratamento de cânceres, através do combate dos radicais livres gerados pela exposição a raios UV (ultravioleta), um dos principais fatores físicos de indução tumoral na pele (SOARES, 2002).

A oxidação nos sistemas biológicos ocorre devido à ação dos radicais livres presentes no organismo. Estas moléculas têm um elétron desemparelhado, livre para se ligar a qualquer outro elétron. Esses radicais causam diversas alterações no organismo, como reações de oxidação nos ácidos graxos da bicamada lipídica da membrana plasmática, denominadas de peroxidação lipoproteica, que afetam a integridade estrutural e funcional da membrana celular. Além disso, os produtos da oxidação dos lipídios podem causar alterações em certas funções celulares (RICE-EVANS & BURDON, 1993). Os radicais livres podem provocar também modificações nas proteínas celulares, resultando em sua fragmentação, *crosslinking e* agregação com aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica (HALLIWELL et al., 1995).

Russo et al. (2008) utilizaram dois compostos oriundos de liquens, de ação antioxidante e que absorvem a luz UV, denominados esfaeroforina (*depside*) e panarina (*depsidone*), sobre linhagens celulares de melanoma humano M14. Esses dois compostos inibiram o crescimento dessas células, induzindo morte celular por apoptose, demonstrada através da fragmentação de DNA genômico e por aumento significativo da atividade de caspase-3. Eles foram correlacionados, em parte, à diminuição da geração de ROS.

1.2. Polifenóis e sua ação antitumoral

A presença de compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividades de inibição da oxidação lipídica e a proliferação de fungos (NAGEN et al., 1992; GAMACHE et al., 1993; IVANOVA et al., 1997; AZIZ et al., 1998; FERNÁNDEZ et al., 1998; HOLLMAN & KATAN, 1998). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT, 1998). Esses compostos englobam uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas) e possuem, na maioria das vezes, grande polaridade e alta reatividade, além de serem susceptíveis a enzimas (KING & YOUNG, 1999).

Os ácidos fenólicos, por sua constituição química, possuem propriedades antioxidantes. Caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila (função éter) na molécula, conferindo propriedades antioxidantes, pois neutralizam radicais livres gerados no organismo. Por isso, são indicados para o tratamento e prevenção de várias doenças, como cardiovasculares e câncer, dentre outras (KERRY & ABBEY, 1997; BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSON & HARRIS, 1999; POLÁSEK et al., 2006). Estudos recentes relataram que os polifenóis podem diminuir a reação de eritema induzida por UV, bem como a carcinogênese, câncer de pele epitelial e metástase de melanoma (SOARES, 2002; MOEHRLE et al., 2009).

Em estudos realizados por Zessner et al. (2008), os polifenóis e as procianidinas encontrados em maçã inibiram o crescimento de células de melanoma murino B16 e células de tumor mamário BALB-MC.E12 e aumentaram a sobrevida dos camundongos que receberam células transplantadas de B16. Os resultados indicaram que os antioxidantes de baixo peso molecular, incluindo ácido clorogênico, flavana-3-ols e flavonóides, foram os responsáveis pelo seqüestro dos radicais 1,1-difenil-2-picril hidracilo (DPPH) e peroxil, de ação oxidante, o que pode ter acarretado em um efeito protetor no desenvolvimento da neoplasia.

Roomi et al. (2006) analisaram o efeito de uma dieta nutritiva (DN) contendo lisina, prolina, arginina, ácido ascórbico, ácido clorogênico e extrato de chá verde sobre o crescimento de tumores induzido pela implantação de

células de melanoma metastático humano A2058 em camundongos *nude*. Os resultados mostraram que a DN suprimiu fortemente o crescimento de tumores (até 57%), sem efeitos adversos aos animais. *In vitro*, essa combinação de compostos, referente à composição da dieta, inibiu o crescimento celular do melanoma por 64% a 500 µg/mL e a invasão pelo matrigel® por 95% a 100 µg/mL; o que sugere que a DN pode ter um potencial terapêutico do melanoma. Em outro estudo, investigou-se também o efeito dessa mistura nutritiva (DN) na metástase pulmonar de células de melanoma B16F0 em camundongos C57Bl/6. A colonização pulmonar foi reduzida em 63% nos animais que receberam a DN, em 86% naqueles que receberam a DN por injeções e completamente inibida nos camundongos inoculados com células de melanoma pré-tratadas com a DN; o que sugere que tal dieta também é eficaz na inibição da metástase de células de melanoma B16F0. Os mecanismos antimutagênicos e anticarcinogênicos proporcionados pelos polifenóis presentes no chá sugerem que a inibição dos tumores pode ser devida a mecanismos extra e intracelulares, incluindo modulação, bloqueio ou supressão do metabolismo, modulação da replicação e dos efeitos de reparo do DNA e inibição do aparecimento, progressão tumoral, invasão e metástase (KURODA & HARA, 1999).

A (-)-epigalocatequina-3-galato, polifenol encontrado em muitas espécies vegetais, tem sido relacionada à atividade antioxidante e à capacidade de induzir apoptose em células tumorais (MARTI-MESTRES et al., 2007; OLMOS et al., 2007; MIURA et al., 2008).

1.3. Ácido clorogênico

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também ligar-se entre si ou com outros compostos. Uma das combinações mais importantes destes ácidos ocorre com o ácido cafeico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico. Este ácido é polar, sendo retirado pelo extrato de etanol 60%, e é encontrado em várias espécies vegetais (KURODA & HARA, 1999; KADOMA & FUJISAWA, 2008).

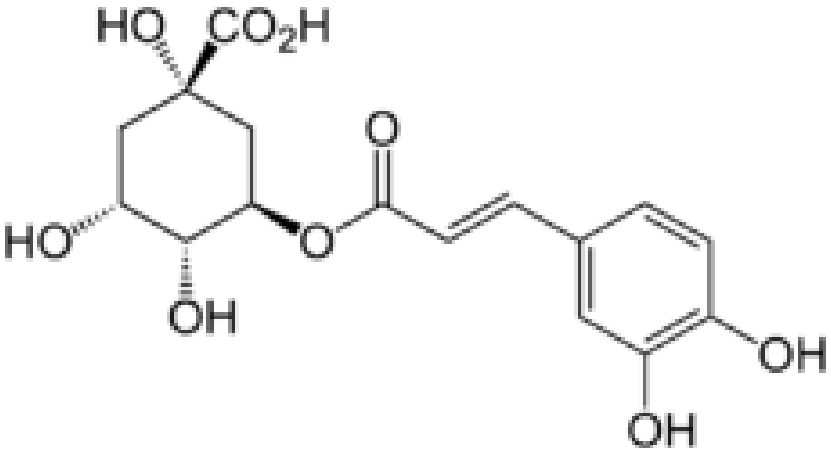


Figura 1. Fórmula estrutural do ácido clorogênico.

Compostos fenólicos não-flavonoides, como os ácidos clorogênico e cafeico, são amplamente utilizados como antioxidantes. O café é uma grande fonte de ácido clorogênico, sendo esse polifenol também encontrado em maçãs, pêras, uvas, alcachofras e berinjelas, dentre outras. Uma dieta contendo altos índices de ácido clorogênico foi capaz de reduzir a promoção tumoral em camundongos (HUANG et al., 1991; STONER & MUKHTAR, 1995; GUPTA et al., 2002).

Huang et al. (1988) analisaram a ação de vários compostos antioxidantes sobre a promoção de tumores de pele. Avaliou-se o efeito de curcumina, ácido clorogênico, ácidos cafeico e ferrúlico sobre a atividade da ornitina decarboxilase epidermal por TPA (12-O-tetradenoilforbol-13-acetato), um carcinogênico bem descrito na literatura (BOUTWELL et al., 1983; RAKIB et al., 2010). No estudo, camundongos receberam doses tópicas de 0,5, 1, 3 ou 10 µM de cada composto. A administração de ácido clorogênico inibiu 25% a indução de ornitina decarboxilase por 5 nmol de TPA. Ainda neste estudo, a aplicação tópica de 10 nmol de ácido clorogênico com 5 nmol de TPA, duas vezes por semana por 20 dias, inibiu 60% o número de tumores induzidos por TPA. Os autores ainda relataram que altas doses de ácidos fenólicos, entre os quais se encontra o ácido clorogênico, causaram pronunciada redução da promoção tumoral.

Facino et al. (1995) comprovaram que cafeoil-derivados, como o ácido clorogênico, possuem efeito protetor contra radicais livres que induzem a

degradação de colágeno tipo III, o que leva à hipótese que tais compostos poderiam inibir a degradação de componentes da matriz extracelular e a metástase (NAGAO et al. 2001).

Granado-Serrano et al. (2007) realizaram estudos com (-)-epicatequina e ácido clorogênico sobre apoptose e vias de proliferação/sobrevivência em linhagens de hepatoma humano HepG2, que foram tratadas com uma faixa de concentração de 0 a 100 µM de cada composto, por 18 horas. No caso do ácido clorogênico, a viabilidade celular, avaliada por Azul de Tripan, variou de 97,3±0,7 a 93,5±1,0%, não apresentando toxicidade. Entretanto, os dois compostos utilizados induziram diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que tal ácido possa ter efeito protetor quanto ao aparecimento de tumores, e não terapêutico.

Estudos recentes mostraram que o ácido clorogênico age como inibidor do transportador de glicose-6-fosfato (G6PT), que reduz a mobilização de Ca^{2+} mediada por esfingosina-1-fosfato (S1P), um lipídio bioativo que estimula o crescimento e invasividade de células de glioblastoma. O tratamento com 100 µM de ácido clorogênico por 18 horas foi capaz de inibir a ação de S1P (CURRIE et al., 2007; FORTIER et al., 2008), o que reforça seu potencial quimioprotetor.

2. OBJETIVO

Avaliar a ação antineoplásica de ácido clorogênico sobre linhagens de melanoma metastático humano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares

As linhagens de melanoma metastático humano utilizadas neste trabalho foram SK-Mel-28, -103 e -147, cujas mutações estão descritas na tabela 1. As culturas primárias de melanócitos humanos normais FM305 foram utilizadas como controle do experimento. Todas as linhagens e culturas primárias foram gentilmente doadas pela Prof[a]. Dr[a]. María Soengas, (CNIO, Espanha).

Tabela 1. Linhagens de melanoma metastático humano utilizadas no projeto, disponíveis no Laboratório de Patologia e Citologia Clínica – FCF/USP

	p53	**p53 induzido**	**p14 (RNAm)**	**p16 (RNAm)**	**B-RAF (V599E)**	**N-Ras (éxon 3)**	**Apaf-1 (prot.)**	**Casp. 8 (prot.)**	**Bcl-2 (prot.)**	**Bcl-xL (prot.)**	**Mcl-1**
SK-Mel-28	R273H	-	ND	+	mutante	wt	-/+	++	++	++	++
SK-Mel-103	wt	+	+	+	wt	Q61R	-	+	++	+++	+++
SK-Mel-147	wt	+	-	+	wt	Q61R	-	+	++	+++	+++

Legenda:

- wt: *wild-type* (selvagem);
- RNAm: RNA mensageiro;
- ND: não detectado;
- prot.: proteína;
- p53 R273H: mutação *hot spot* da proteína, resultando na substituição de arginina por histidina no códon 273. Isso ocasiona ganho de função, por perda de funções supressoras de tumor e aquisição de novas atividades oncogênicas (HAINAUT & HOLLSTEIN, 2000; LIU et al., 2010);
- B-RAF (V599E): mutação ocasionada pela substituição de timina por adenina, no códon 1796 (A1796T), que resulta na substituição de valina por ácido glutâmico no códon 599. Ocorre em aproximadamente 50% dos melanomas (GOYDOS et al., 2005);
- N-Ras (éxon 3) Q61R: mutação majoritariamente no códon 61, presente no éxon 3, ocasionada pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 182 (A182G), que resulta na substituição de glutamina por arginina. Ocorre em aproximadamente 20% dos melanomas (FUKUSHIMA & TAKENOSHITA, 2005; GOYDOS et al., 2005).

3.2. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas em estufa de cultura celular a 37°C, em placas de cultura contendo meio de crescimento específico, em atmosfera de 5% de CO_2, para manutenção de pH próximo ao fisiológico. Para as culturas de melanoma metastático utilizou-se DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - GIBCO) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen), 25 µg/mL de ampicilina e 100 µg/mL de streptomicina. Para as culturas de melanócitos humanos utilizou-se meio 254CF (Cascade Biologics) acrescido de HMGS 100x (*Human Melanocyte Growth Supplement 100x* – Cascade Biologics), 0,2 M cloreto de cálcio (Cascade Biologics) e antibióticos, nas mesmas concentrações utilizadas para DMEM. As células foram subcultivadas assim que atingiram 70-80% da densidade de saturação, utilizando, para tanto, lavagem prévia da cultura com solução de PBS·A 1x (tampão fosfato salino com ausência de Ca^{2+} e Mg^{2+}) e, posteriormente, tripsina 0,1% em PBS·A contendo 1 mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultivo contendo 8% DMSO (dimetilsulfóxido) a -196°C, em reservatório com nitrogênio líquido.

3.3. Tratamento das culturas

Para avaliação da atividade antitumoral do ácido clorogênico (Sigma Aldrich), foram utilizadas concentrações de 5 a 100 µM, determinadas a partir de Feng et al. (2005).

3.4. Viabilidade e crescimento celular

3.4.1. Exclusão por Azul de Tripan

A viabilidade e a curva de crescimento celular foram avaliadas pelo ensaio de exclusão por corante Azul de Tripan 0,4% em PBS (FRESHNEY, 1987), no qual as células foram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentaram a coloração azul em seu interior. Para a realização dos ensaios, foram plaqueadas 30.000 células por poço, em placas de 24 poços, contendo, cada poço, 1 mL de meio. Após atingirem

aproximadamente 50% de confluência, em média 24 horas após o plaqueamento, o meio foi retirado e, então, adicionou-se meio contendo diferentes concentrações do composto. Posterior a essa etapa, para leituras em tempos distintos, as células foram coletadas através de tripsinização e adicionou-se à suspensão de células o corante Azul de Tripan 0,4%, na proporção de 1v/1v com DMEM. Para o ensaio de viabilidade, foram contadas aproximadamente 100 células viáveis por campo na câmera de Neubauer. Para as curvas de crescimento celular, foram contadas todas as células presentes (vivas e mortas) no campo e, utilizando-se o fator de correção, calculou-se o número total de células. O programa Microsoft Excel® foi utilizado para os cálculos das médias e desvios-padrão e confecção dos gráficos.

3.5. Invasão celular

3.5.1. Invasão em Matrigel, utilizando câmara de Boyden

Para este ensaio, foi utilizado o protocolo proposto por Lochter et al. (1997), brevemente descrito a seguir:

Os insertos com poros de 8 µm (BD), acondicionados em placa de 24 poços, foram recobertos com 20 µL de Matrigel (BD) diluído 1:6 em DMEM sem soro (cerca de 2-3 mg/mL de proteína) e incubados por 30 minutos em estufa de CO_2, a 37°C. Em seguida, foram plaqueadas sobre o Matrigel $5x10^4$ células de melanoma/200 µL de DMEM sem soro e adicionou-se 300 µL de meio à câmara inferior. Como controle positivo, utilizou-se DMEM com 10% SFB na câmara inferior e como controle negativo, DMEM sem soro. Após 24 horas, o meio de cultura da câmara inferior foi aspirado e as células foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBS·A por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a câmara inferior foi lavada três vezes com água destilada e as células foram coradas com solução de 0,5% azul de toluidina em 2% Na_2CO_3, por 20 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi retirado através de três lavagens com água destilada e, por fim, as células que permaneceram na superfície da câmara de Boyden foram removidas com auxílio de uma haste flexível com algodão. As células que invadiram o Matrigel, localizadas na superfície inferior da câmara de Boyden, foram visualizadas em microscópio invertido, utilizando-se aumento de 200 vezes.

3.6. Migração celular

3.6.1. Ensaio de ferida

Para este ensaio, foi utilizado protocolo proposto por Liang et al. (2007), brevemente descrito a seguir:

Antes do plaqueamento, foram delimitadas linhas no fundo da placa, na altura do diâmetro dos poços, a fim de servir de guia para as fotos do experimento. Desta forma, as fotos foram sempre tiradas imediatamente acima da linha traçada. Foram plaqueadas $5x10^5$ células em placas com 35 mm de diâmetro. Após 90-100% de confluência, fez-se na cultura um "arranhão", perpendicularmente à linha traçada, utilizando ponteira estéril de micropipeta de 1 mL. Em seguida, cada placa foi lavada duas vezes com PBS^{-}A. Adicionou-se meio de cultura contendo SFB e ácido clorogênico. Para o controle, utilizou-se placa contendo somente meio com soro. As placas foram fotografadas em tempos de 0 a 24 horas, ou até o fechamento da ferida da cultura controle, e comparadas com o controle.

3.7. Avaliação de parada de ciclo celular

3.7.1. FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) para identificação de parada de ciclo celular

Para a realização do ensaio, foram cultivadas $15x10^4$ células por poço, em placas de 6 poços, contendo, cada poço, 3 mL de meio. Após atingirem aproximadamente 50% de confluência, em média 24 horas após o plaqueamento, o meio foi retirado e, então, adicionou-se meio contendo ácido clorogênico. Após o período de tratamento, as células foram coletadas, lavadas uma vez com PBS^{-}A e lisadas com 300 µL/amostra de tampão de lise (Triton X-100 0,1%, citrato de sódio 0,1%, 0,02 mg/mL de iodeto de propídeo em PBS^{-}A). Após 30 minutos de incubação, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, para identificação de todas as fases do ciclo celular. Utilizaram-se os softwares FlowJo™ e Microsoft Excel® para a confeccção dos gráficos.

3.8. Análise de expressão proteica através de ensaios de Western Blot

3.8.1. Extração proteica

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas com 100 mm de diâmetro. Quando as culturas atingiram aproximadamente 50% de confluência, as células foram tratadas com ácido clorogênico. Após o tempo de tratamento, as culturas foram lavadas duas vezes com PBS·A gelado e, após essa etapa, adicionou-se 70-100 µL de tampão de lise RIPA (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, NP-40 1%, 1mM EGTA pH 7,4, 1mM EDTA pH 7,4, SDS 0,05%, inibidor de proteases (Roche) e inibidor de fostatases (Sigma)). Com o auxílio de *cellscraper*, as células foram coletadas, transferidas para um tubo cônico e incubadas por 20 minutos a 4°C. Os tubos foram centrifugados a 13.5000 rpm (rotações por minutos) por 15 minutos, a 4°C, obtendo-se, assim, a fração nuclear (sedimento) e a fração citoplasmática (sobrenadante). A fração citoplasmática foi coletada, o material foi aliquotado e estocado a - 80°C. Todo o processo foi realizado a 4°C.

3.8.2. Fracionamento de proteínas utilizando eletroforese em gel de acrilamida e reação com o anticorpo

As amostras foram normalizadas de acordo com a quantidade de proteína, utilizando-se o método de Bradford (1976), com o uso de Reagente de Bradford (Bio-Rad) e curva padrão de BSA (albumina sérica bovina). Em geral, utilizou-se 30 µg de proteína total para cada canal.

Utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (30 acrilamida: 1 bisacrilamida) 10-15% para fracionamento das proteínas. Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, utilizando-se transferência úmida a 4°C. As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio constituída de 5% de leite desnatado em pó em PBS acrescido com 0,02% de Tween 20, à temperatura ambiente, por aproximadamente 1 hora e incubadas *overnight* (16 a 20 horas) com o anticorpo desejado diluído em solução de bloqueio, com agitação, a 4°C. O anticorpo utilizado foi anti-human p53 (Vector). As membranas foram então lavadas três vezes em PBS acrescido com 0,02% de Tween 20 (Roche) e incubadas com o anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio por 2

horas à temperatura ambiente, com agitação. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes em PBS acrescido com 0,02% de Tween 20 e reveladas por quimioluminescência, utilizando-se o Kit ECL para Detecção de Proteínas (Amersham). As membranas foram expostas a filmes de raios-X (Kodak X omat K) por diferentes períodos de tempo.

3.9. Análise estatística

Os resultados dos ensaios foram expressos em média ± desvio-padrão e analisados estatisticamente, usando o software Graphpad Instat™ (*One-way analysis of variance,* ANOVA), com valor de significância de $p<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Viabilidade celular

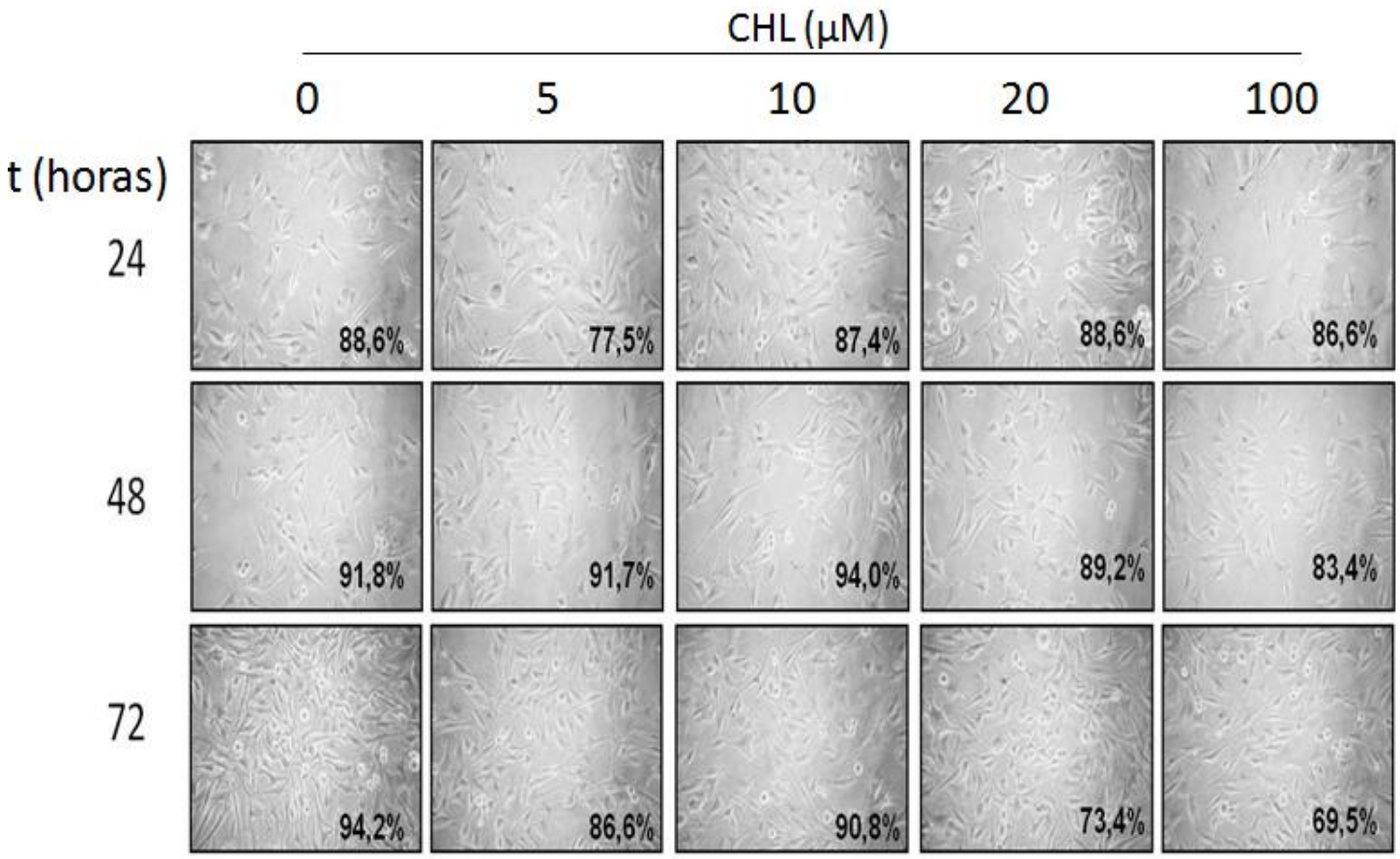
A viabilidade de células de melanoma e melanócitos foi avaliada pelo ensaio de Azul de Tripan, a fim de verificar se o ácido clorogênico seria capaz de inibir a viabilidade das linhagens de melanoma, comparado-se ao controle (melanócitos) e se o mesmo poderia interferir na viabilidade de células não neoplásicas.

As figuras de 1 a 4 mostram a morfologia **(a)** e porcentagem de viabilidade **(b)** e das culturas tratadas com ácido clorogênico.

Observa-se que o ácido clorogênico não inibiu a viabilidade das células tumorais, nem alterou a morfologia destas (figs. 1, 2 e 3).

Sobre a linhagem controle, melanócitos humanos normais FM305, como demonstra a Fig.4, o ácido clorogênico também não interferiu na viabilidade dessas células.

a)



b)

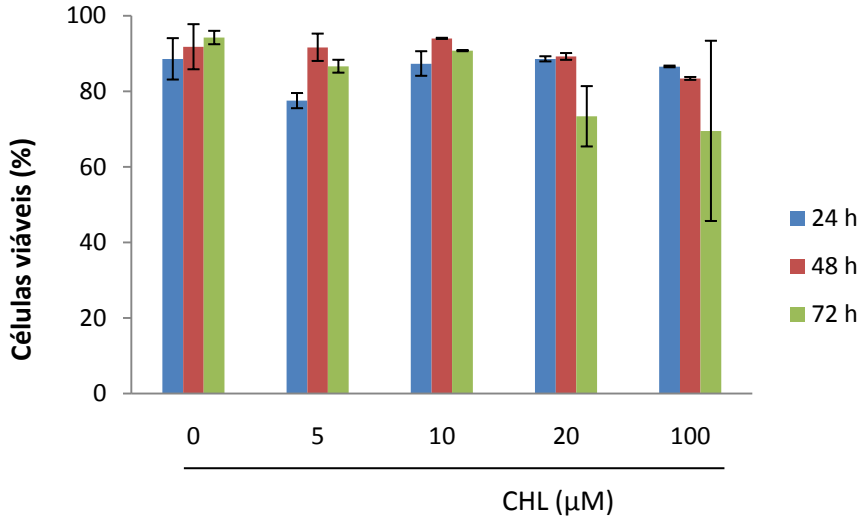
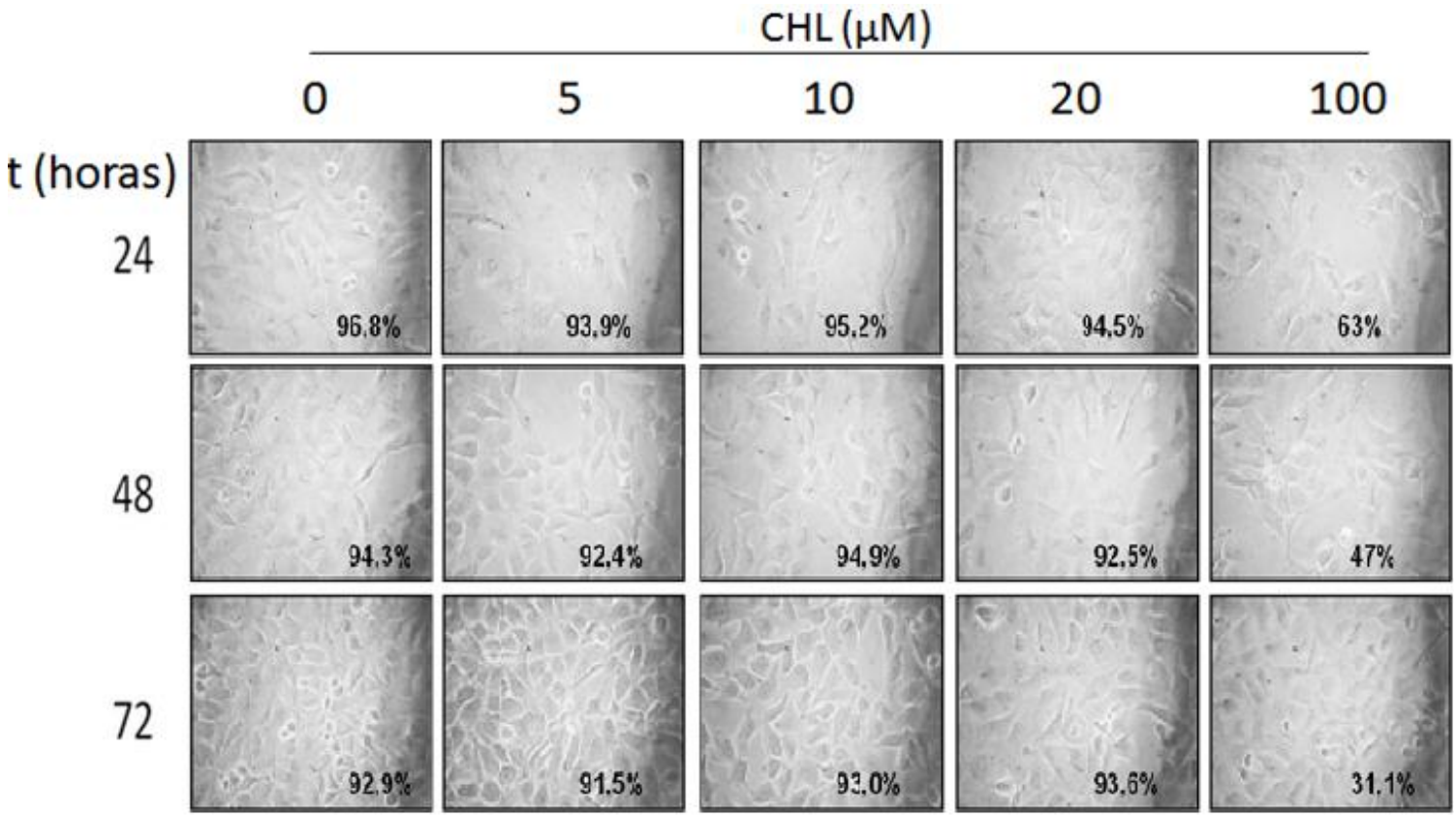


Figura 1. Viabilidade celular da linhagem de melanoma metastático humano SK-Mel-28 tratada com diferentes concentrações de ácido clorogênico (CHL), em função do tempo. **(a)** Microscopia óptica das culturas tratadas (aumento: 200x) e **(b)** Viabilidade celular em relação à porcentagem de células vivas.

a)



b)

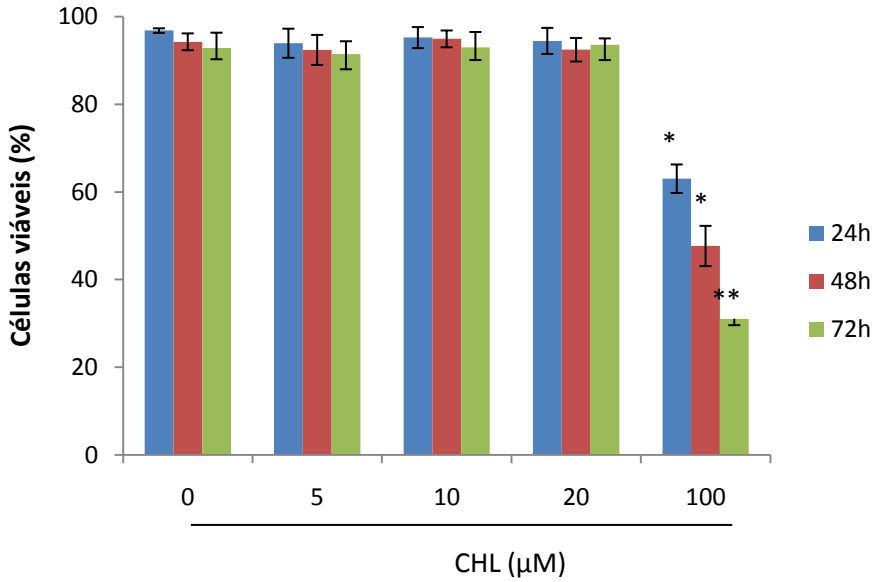
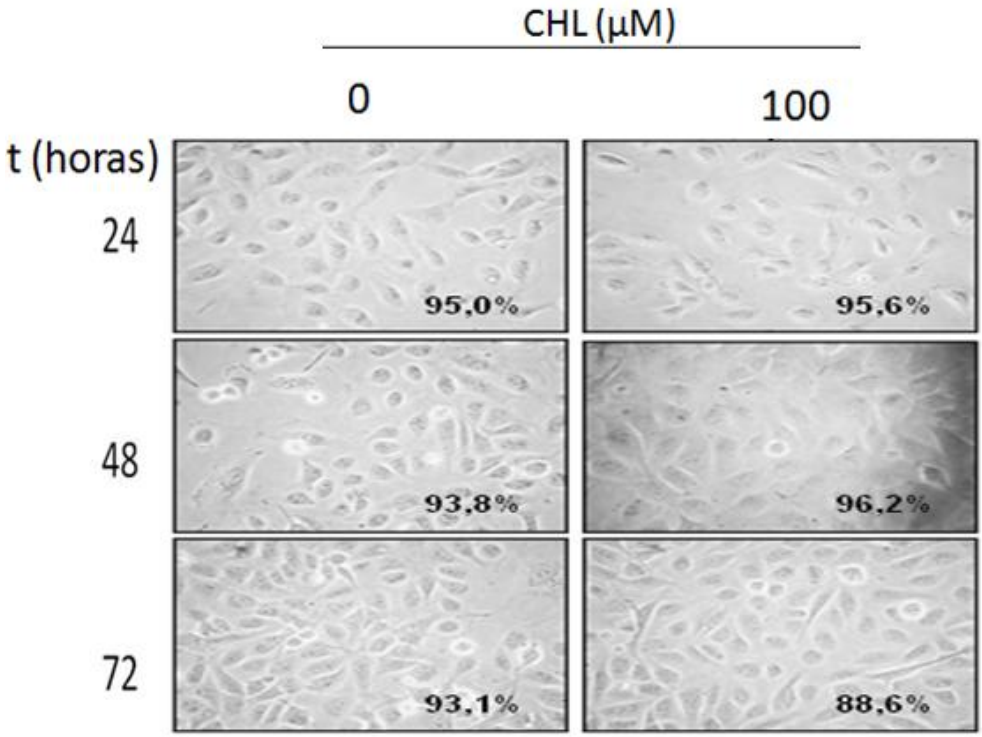


Figura 2. Viabilidade celular da linhagem de melanoma metastático humano SK-Mel-103 tratada com diferentes concentrações de ácido clorogênico (CHL), em função do tempo. **(a)** Microscopia óptica das culturas tratadas (aumento: 200x) e **(b)** Viabilidade celular em relação à porcentagem de células vivas.

a)



b)

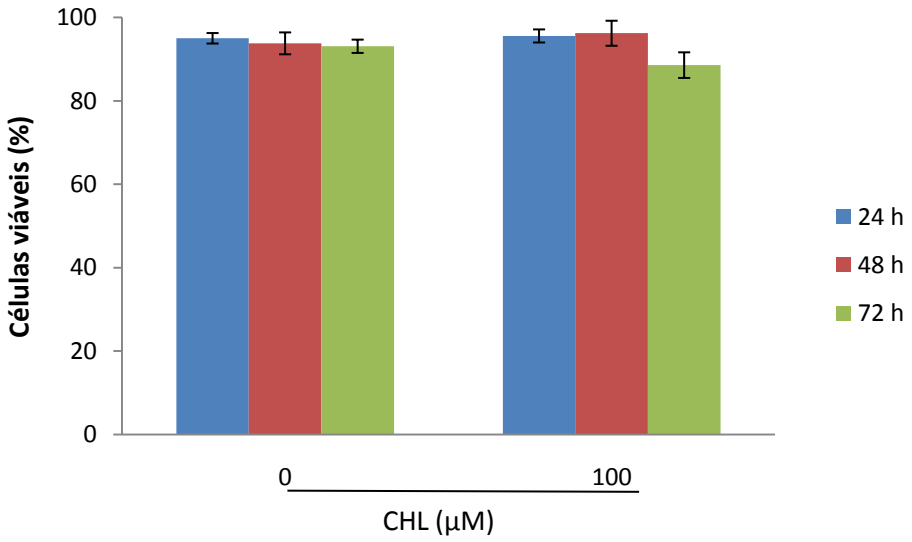
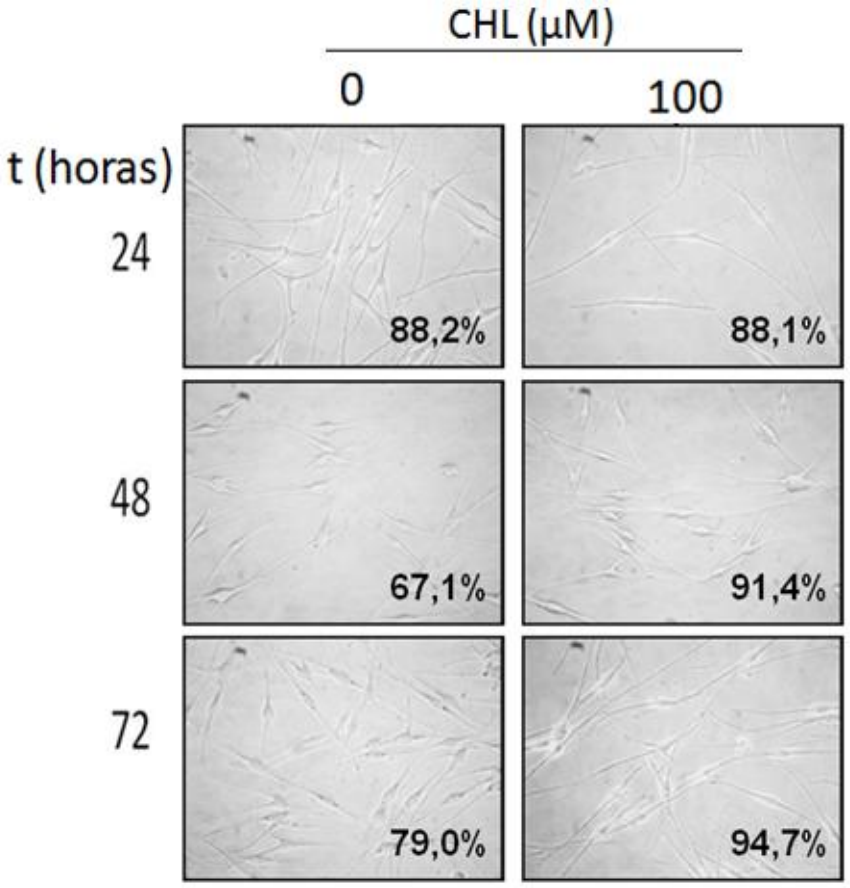


Figura 3. Viabilidade celular da linhagem de melanoma metastático humano SK-Mel-147 tratada com diferentes concentrações de ácido clorogênico (CHL), em função do tempo. **(a)** Microscopia óptica das culturas tratadas (aumento: 200x) e **(b)** Viabilidade celular em relação à porcentagem de células vivas.

a)



b)

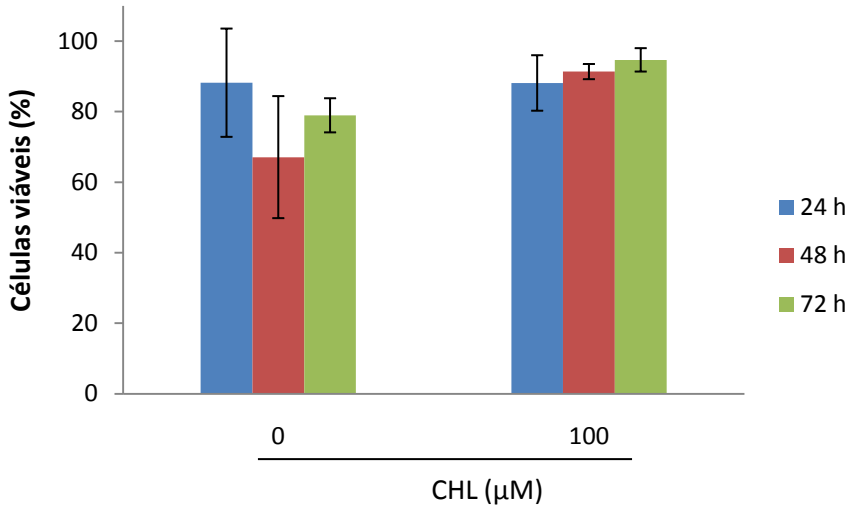


Figura 4. Viabilidade celular da cultura primária de melanócitos normais FM305 tratada com diferentes concentrações de ácido clorogênico (CHL), em função do tempo. **(a)** Microscopia óptica das culturas tratadas (aumento: 200x) e **(b)** Viabilidade celular em relação à porcentagem de células vivas.

4.2. Invasão e migração celular *in vitro*

Para avaliar se o ácido clorogênico seria capaz de inibir a invasão de células de melanoma *in vitro*, realizou-se o ensaio de invasão por Matrigel em câmara de Boyden.

Na figura 5, referente á invasão da SK-Mel-103, não se observa interferência da invasão pelo tratamento com o composto.

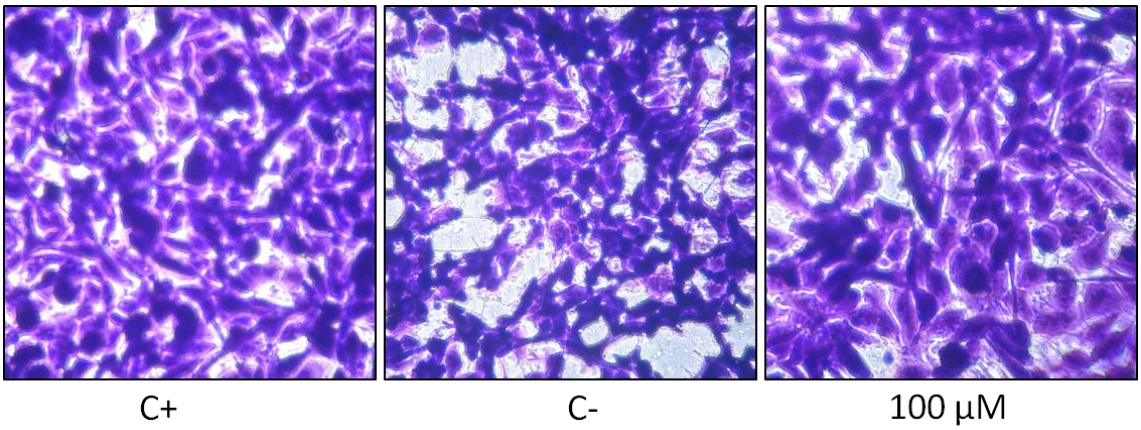


Figura 5. Invasão através de Matrigel de células de melanoma metastático humano SK-Mel-103 com tratadas com 100 µM de ácido clorogênico por 24 horas. **C+:** controle positivo (com quimioatraente), **C-:** controle negativo (sem quimioatraente). Aumento: 200x.

Avaliou-se também se o acido clorogênico seria capaz de inibir a migração celular, na ausência de SFB, através do ensaio de ferida.

Como verificado na figura 6, tal composto também não interferiu no processo migratório das linhagens tumorais.

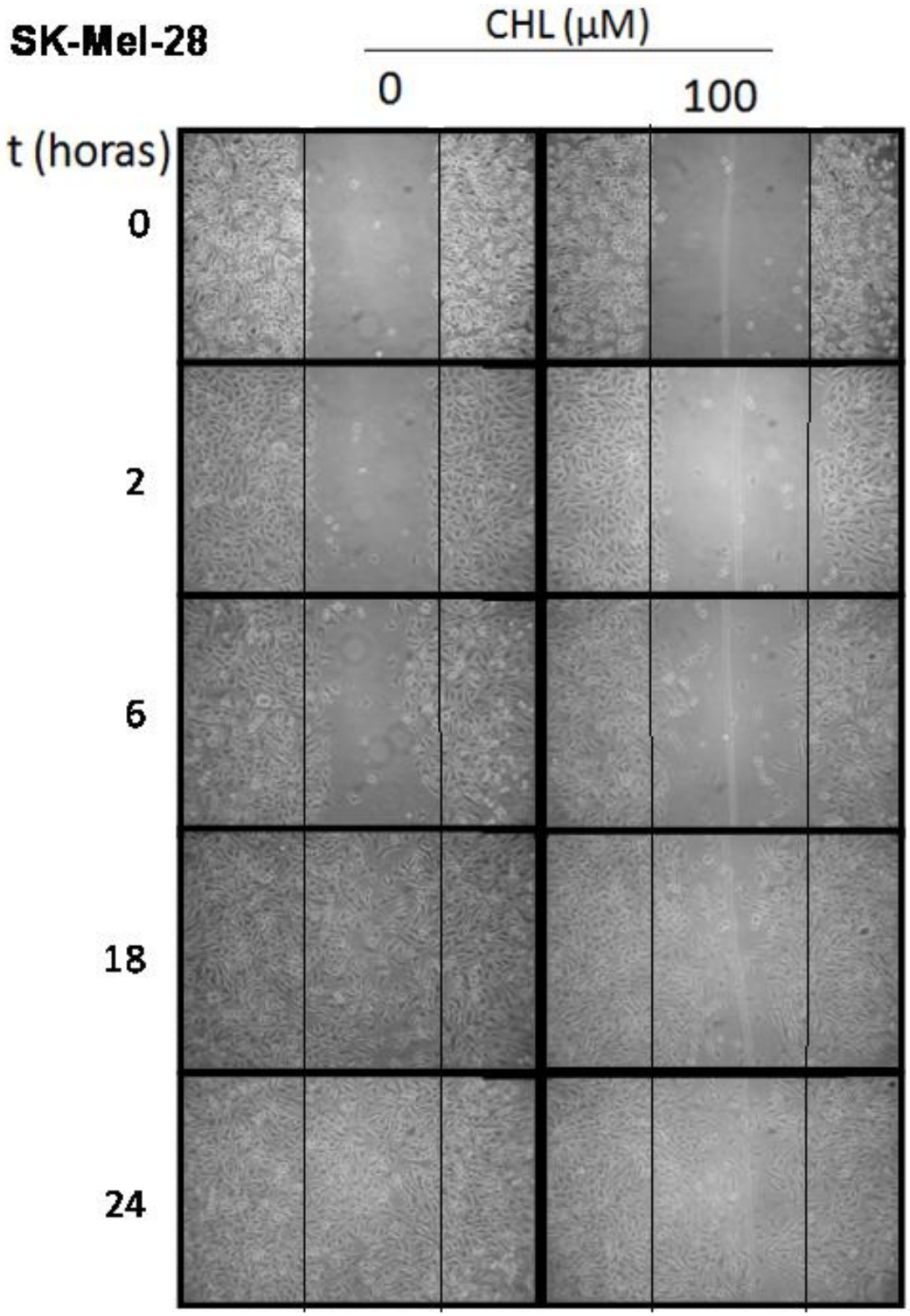


Figura 6. Migração celular de linhagem de melanoma metastático humano SK-Mel-28 tratada com 100 µM de ácido clorogênico durante 24 horas. Aumento: 100x.

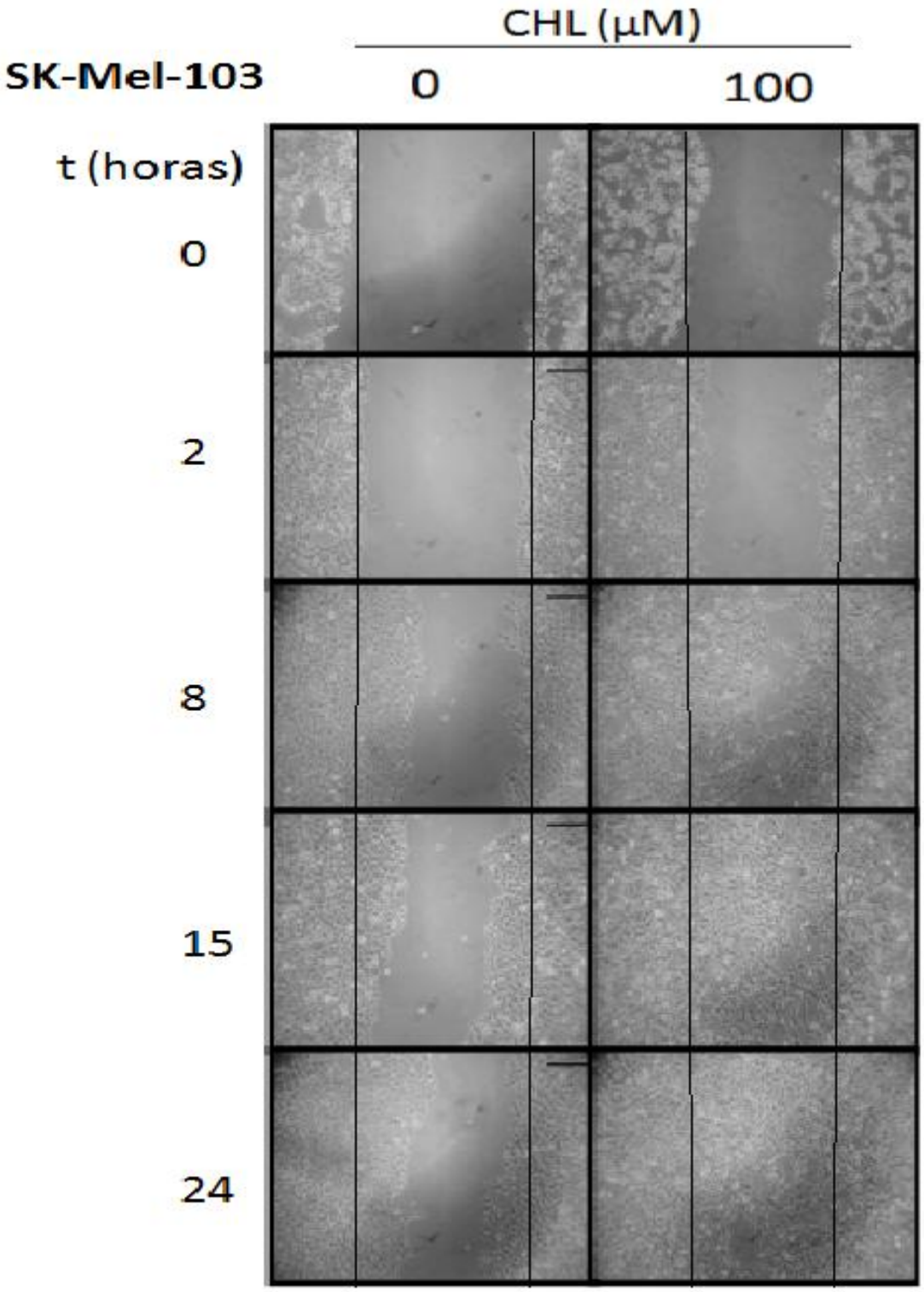
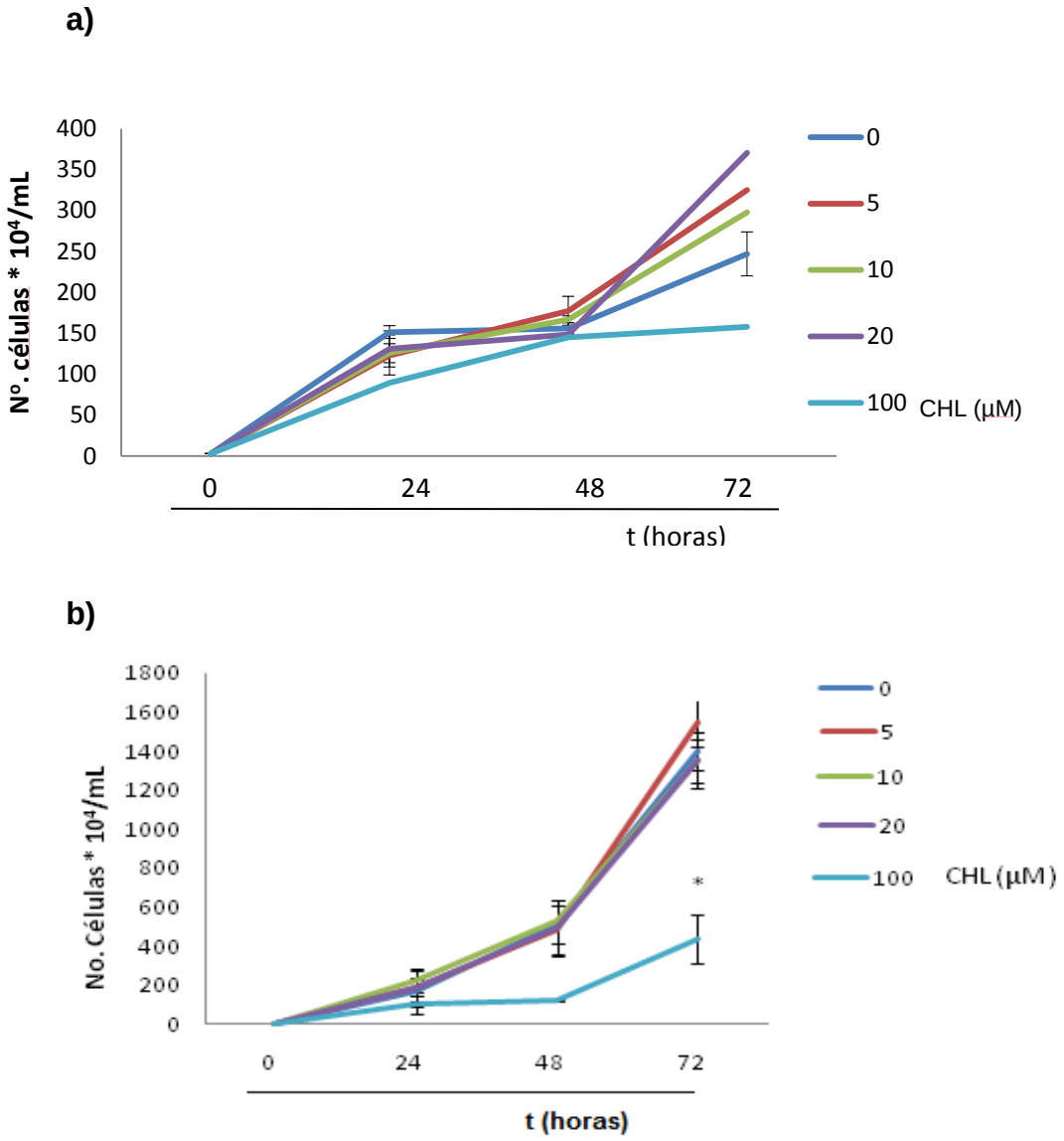


Figura 7. Migração celular de linhagem de melanoma metastático humano SK-Mel-103 tratada com 100 µM de ácido clorogênico durante 24 horas. Aumento: 100x.

4.3. Proliferação celular

A fim de avaliar se o ácido clorogênico poderia interferir na proliferação de células neoplásicas, observou-se se esse composto seria capaz de inibir o crescimento das linhagens tumorais.

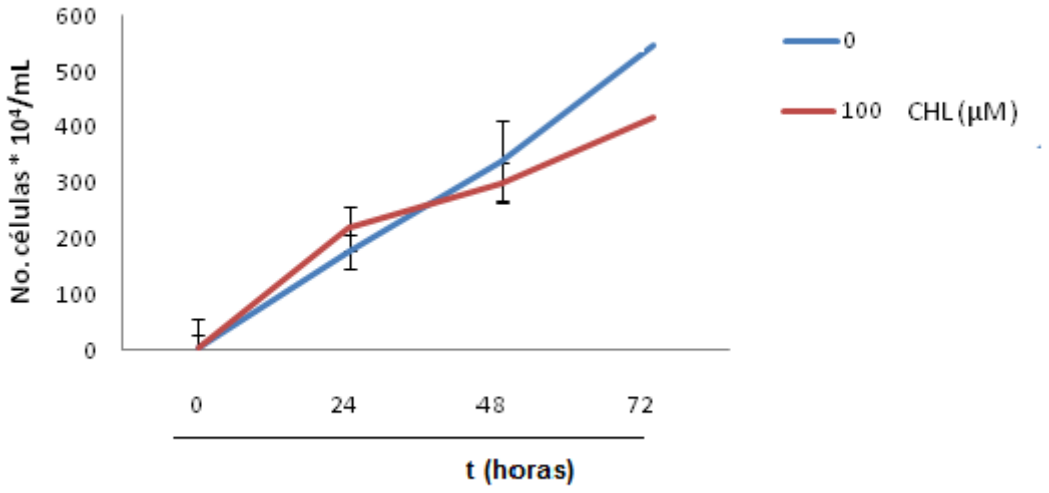
Como verificado na figura 8, o tratamento com 100 µM de ácido clorogênico foi capaz de inibir o crescimento de 50% das células de melanoma SK-Mel-103 (fig. 8b), sem alteração de sua morfologia e viabilidade celular, o que não foi observado nas outras linhagens neoplásicas e na linhagem normal.



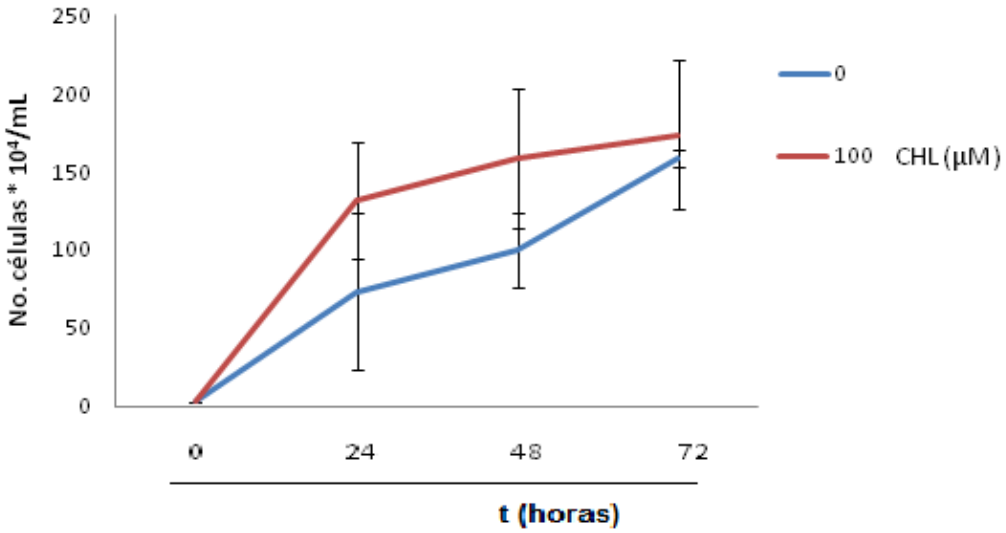
Figuras 8a e 8b. Curvas de crescimentos das linhagens de melanoma SK-Mel-28 **(a)** e -103 **(b)**.

c)

d)d



d)



Figuras 8c e 8d. Curvas de crescimentos da linhagem de melanoma SK-Mel-147 **(c)** e cultura primária de melanócitos normais FM305 **(d)**.

Para verificar se a alteração na taxa de crescimento celular estava relacionada à parada em alguma fase do ciclo celular, realizou-se ensaio de citometria de fluxo com a linhagem SK-Mel-103. A linhagem SK-Mel-28 foi utilizada como controle do ensaio, para avaliar s o composto possuía caráter linhagem-específico.

Como observado na fig. 9, o tratamento com o ácido clorogênico não interferiu significamente nas fases do ciclo celular.

a)

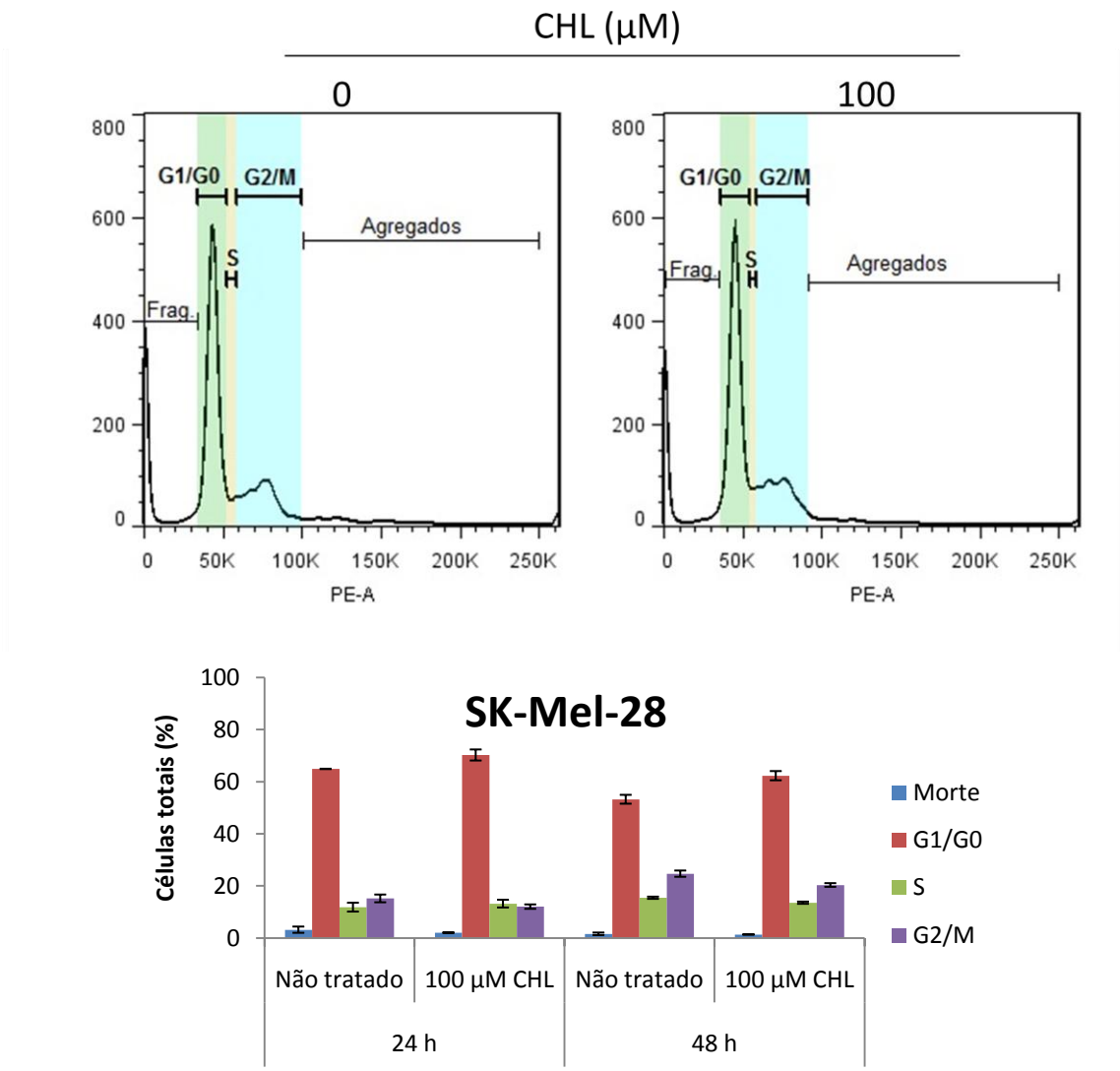
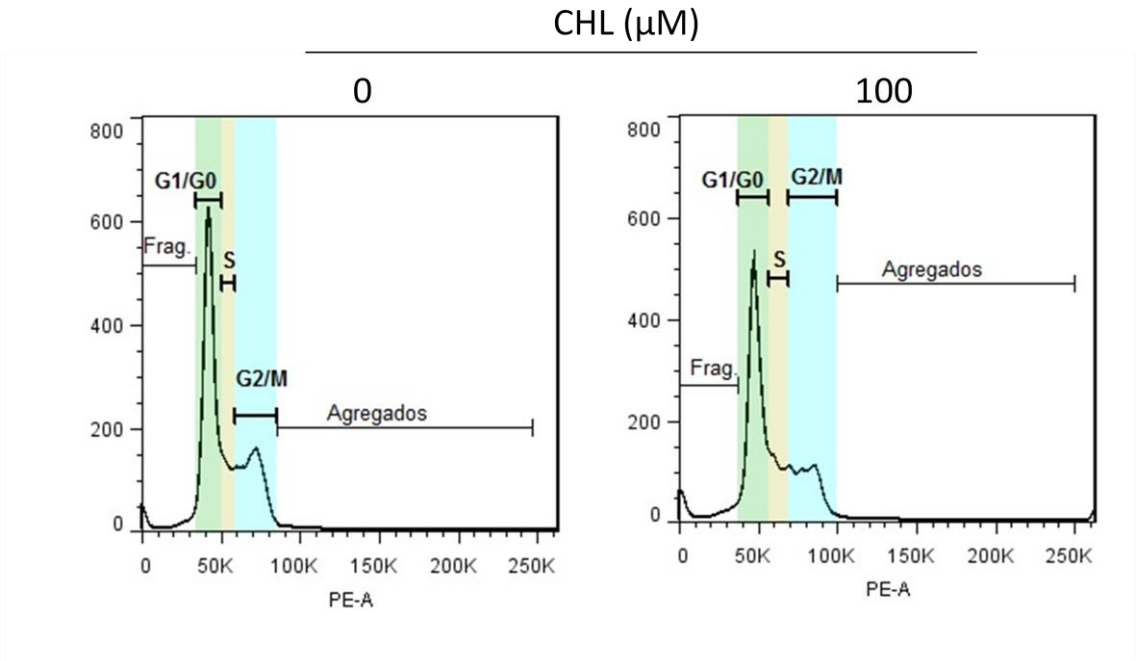


Figura 9a. Fases do ciclo celular **(a)** da linhagem de melanoma metastático humano SK-Mel-28 tratada com 100 µM de ácido clorogênico (CHL) por 48 horas. **(b)** Dados plotados da porcentagem de células em 10.000 eventos em cada fase do ciclo, em período de tratamento de 24 a 48 horas.

b)



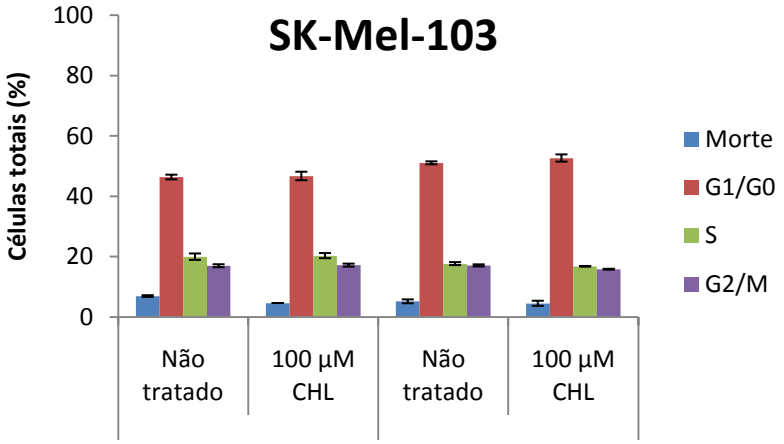


Figura 9b. Fases do ciclo celular **(a)** da linhagem de melanoma metastático humano SK-Mel-103 tratada com 100 µM de ácido clorogênico (CHL) por 48 horas. **(b)** Dados plotados da porcentagem de células em 10.000 eventos em cada fase do ciclo, em período de tratamento de 24 a 48 horas.

4.4. Indução de morte celular

Como o ácido clorogênico foi capaz de inibir o crescimento da linhagem SK-Mel-103, que, dentre outras alterações genotípicas, é selvagem para p53, avaliou-se se a modulação dessa proteina poderia influenciar na sensibilidade da célula ao composto.

A figura 10 mostra a expressão de 53 nas linhagens tratadas com ácido clorogênico, em diferentes tempos. As linhagens foram comparadas por Western Blot e, como pode ser observado, não houve diferença na indução de p53 nas células tratadas com ácido clorogênico, quando comparado ao controle não tratado.

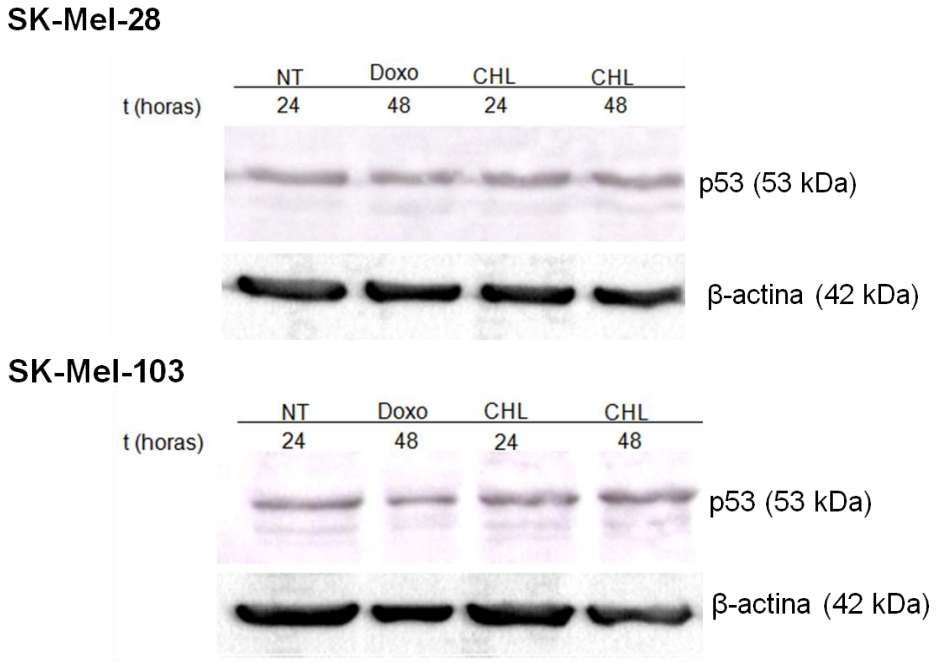


Figura 10. Quantificação protéica de p53 nas linhagens tumorais SK-Mel-28 e -103 tratadas com ácido clorogênico. NT: não tratado; Doxo: tratado com 1,2 µM de doxorrubicina; CHL: tratado com 100 µM de ácido clorogênico.

DISCUSSÃO

As propriedades antineoplásicas do ácido clorogênico já foram relatadas em um grande número de tumores, exceto melanoma, porém os mecanismos que levam à sua ação antitumoral ainda não foram bem elucidados. Diante de trabalhos enfatizando o efeito quimioprotetor dos polifenóis, referentes à sua ação antioxidante em células neoplásicas e com potencial metastático, não há na literatura estudos que comprovem a eficácia do ácido clorogênico em células de melanoma metastático humano. Embora existam estudos que avaliem o potencial antitumoral de chá verde, maçã, batata-doce e café, todos ricos em ácido clorogênico, os efeitos desse ácido em células de melanoma humano não são relatados na literatura (NAGAO et al., 2001; CHIANG et al., 2003).

Apesar dos dados promissores encontrados na literatura sobre o potencial tumoral do ácido clorogênico (BOYER & LIU, 2004; RAMOS et al., 2005; HIGDON & FREI, 2006; LEE & ZHU, 2006; YIP et al., 2006; MIURA et al., 2007; KURATA et al., 2007; MIURA et al., 2008; TAO et al., 2008; ZESSNER et al., 2008), os resultados obtidos em nosso laboratório sugerem que tal composto fenólico não é um bom candidato para a terapia de melanoma, pois nos ensaios realizados, embora tenha inibido o crescimento da linhagem SK-Mel-103, não interferiu em nenhum outro processo avaliado importante na promoção de melanoma, como invasão, migração, parada de ciclo celular, modulação da indução do supressor de tumor p53.

Realizou-se o ensaio de avaliação de ciclo celular e expressão de p53, a fim de explicar o efeito antiproliferativo desse composto sobre as células de melanoma SK-Mel-103. Esse composto não foi capaz de induzir parada em nenhuma fase do ciclo celular nas linhagens de melanoma testadas e tal ensaio também demonstra a baixa indução de citotoxicidade pelo ácido clorogênico, já verificado nos ensaios anteriores.

A recente literatura aponta que o ácido clorogênico não é capaz inibir a tumorigênese, embora possa reduzir os níveis de estresse oxidativo, importante processo de indução tumoral (PARK et al., 2010).

Sua ação antitumoral descrita na literatura pode ser explicada por seu efeito quimioprotetor, através do seqüestro de radicais livres, que inibiriam os

processos iniciais de desenvolvimento do tumor (FORTIER et al., 2008). Em linhagens metastáticas e que apresentam quimiorresistência elevada, como as testadas neste trabalho, ele não é capaz de inibir e/ou reverter o fenótipo neoplásico.

CONCLUSÃO

De acordo com os dados apresentados, conclui-se que o ácido clorogênico não é capaz de induzir, nem mesmo inibir, os processos de invasão, migração ou parada de ciclo celular nas concentrações testadas.

BIBLIOGRAFIA

ABOU-ALFA, G. K.; JOHNSON, P.; KNOX, J. J.; CAPANU, M.; DAVIDENKO, I.; LACAVA, J.; LEUNG, T.; GANSUKH, B.; SALTZ, L. B. Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial. *JAMA*. 304 (19): 2154-2160. 2010.

AGARWALA, S.; KUMAR, R.; BHATNAGAR, V.; BAJPAI, M.; GUPTA, D. K.; MITRA, D. K. High incidence of adriamycin cardiotoxicity in children even at low cumulative doses: role of radionuclide cardiac angiography. *J. Pediatr. Surg.* 35 (12): 1786-1789. 2000.

AHMED, F.; STEELE, J. C.; HERBERT, J. M.; STEVEN, N. M.; BICKNELL, R. Tumor stroma as a target in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets*. 8 (6): 447-453. 2008.

AJANI, G.; SATO, N.; MACK, J. A.; MAYTIN, E. V. Cellular responses to disruption of the permeability barrier in a three-dimensional organotypic epidermal model. *Exp. Cell Res.* 313: 3005-3015. 2007.

ALBRIGHT, C. F.; GRACIANI, N.; HAN, W.; YUE, E.; STEIN, R.; LAI, Z.; DIAMOND, M.; DOWLING, R.; GRIMMINGER, L.; ZHANG, S. Y.; BEHRENS, D.; MUSSELMAN, A.; BRUCKNER, R.; ZHANG, M.; JIANG, X.; HU, D.; HIGLEY, A.; DIMEO, S.; RAFALSKI, M.; MANDLEKAR, S.; CAR, B.; YELESWARAM, S.; STERN, A.; COPELAND, R. A.; COMBS, A.; SEITZ, S. P.; TRAINOR, G. L.; TAUB, R.; HUANG, P.; OLIFF, A. Matrix metalloproteinase-activated doxorubicin prodrugs inhibit HT1080 xenograft growth better than doxorubicin with less toxicity. *Mol. Cancer Ther*. 4 (5): 751-760. 2005.

ALT-HOLLAND, A.; SHAMIS, Y.; RILEY, K. N.; DESROCHERS, T. M.; FUSENIG, N. E.; HERMAN, I. M.; GARLICK, J. A. E-cadherin suppression directs cytoskeletal rearrangement and intraepithelial tumor cell migration in 3D human skin equivalents. *J. Invest. Dermatol.* 128: 2498-2507. 2008.

ANDROULAKIS, N.; KOUROUSSIS, C.; MAVROUDIS, D.; KAKOLYRIS, S.; SOUGLAKOS, J.; AGELAKI, S.; KALBAKIS, K.; MALAS, K.; PALLIS, A.; SAMONIS, G.; GEORGOULIAS, V. Phase I study of weekly paclitaxel and

liposomal doxorubcin in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer.* 38 (15): 1992-1997. 2002.

ARANCIA, G.; MOLINARI, A.; CALCABRINI, A.; MESCHINI, S.; CIANFRIGLIA, M. Intracellular P-glycoprotein in multidrug resistant tumor cells. *Ital. J. Anat. Embryol.* 106 (2 Suppl 1): 59-68. 2001.

AUBEL-SADRON, G.; LONDOS-GAGLIARDI, D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*. 66 (5): 333-352. 1984.

AZIZ, N. H.; FARAG, S. E.; MOUSA, L. A.; ABO-ZAID, M. A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios*. 93 (374): 43-54. 1998.

BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T. R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. *Burns.* 27: 534-544. 2001.

BARUAH, H.; BARRY, C. G.; BIERBACH, U. Platinum-intercalator conjugates: from DNA-targeted cisplatin derivatives to adenine binding complexes as potential modulators of gene regulation. *Curr. Top Med. Chem.* 4 (15): 1537-1549. 2004.

BENBOW, U.; MAITRA, R.; HAMILTON, J. W.; BRINCKERHOFF, C. E. Selective modulation of collagenase 1 gene expression by the chemotherapeutic agent doxorubicin. *Clin. Cancer Res*. 5 (1): 203-208. 1999.

BENEVIDES, J. M.; THOMAS, G. J. JR. Local conformational changes induced in B-DNA by ethidium intercalation. *Biochemistry*. 44 (8): 2993-2999. 2005.

BENJAMIN, C. L.; MELNIKOVA, V. O.; ANANTHASWAMY, H. N. Models and mechanisms in malignant melanoma. *Mol. Carcinog*.; (8): 671-678. 2007.

BERKING, C.; HERLYN, M. Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology. *Histol. Histopathol*. 16 (2): 669-674. 2001.

BOCCARDO, E.; NOYA, F.; BROKER, T. R.; CHOW, L. T.; VILLA, L. L. HPV-18 confers resistance to TNF alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. *Virology.* 328 (2): 233-243. 2004.

BOLLAG, G.; HIRTH, P.; TSAI J.; ZHANG, J.; IBRAHIM, P. N.; CHO, H.; SPEVAK, W.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; HABETS, G.; BURTON, E. A.; WONG, B.; TSANG, G.; WEST, B. L.; POWELL, B.; SHELLOOE, R.;

MARIMUTHU, A.; NGUYEN, H.; ZHANG, K. Y.; ARTIS, D. R.; SCHLESSINGER, J.; SU, F.; HIGGINS, B.; IYER, R.; D'ANDREA, K.; KOEHLER, A.; STUMM, M.; LIN, P. S.; LEE, R. J.; GRIPPO, J.; PUZANOV, I.; KIM, K. B.; RIBAS, A.; MCARTHUR, G. A.; SOSMAN, J. A.; CHAPMAN, P. B.; FLAHERTY, K. T.; XU, X.; NATHANSON, K. L.; NOLOP, K. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*. 467 (7315): 596-599. 2010.

BONFANTE, V.; BONADONNA, G.; VILLANI, F.; DI FRONZO, G.; MARTINI, A.; CASAZZA, A. M. Preliminary phase I study of 4'-epi-adriamycin. *Cancer Treat. Rep.* 63 (5): 915-918. 1979.

BORNSTEIN, P.; SAGE, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14 (5): 608-616. 2002.

BOUTWELL, R. K.; TAKIGAWA, M.; VERMA, A. K.; ASHENDEL, C. L. Observations on the mechanism of skin tumor promotion by phorbol esters. *Princess Takamatsu Symp*.14: 177-193. 1983.

BOYCE, S. T.; WARDEN, G. D. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. *Am. J. Surg*. 183: 445-56. 2002.

BOYER, J.; LIU, R. H. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J*. 3: 5. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254. 1976.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutr. Rev.* 56 (11): 317-333. 1998.

BRINCKERHOFF, C. E.; RUTTER, J. L.; BENBOW, U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 6 (12): 4823-4830. 2000.

BROHEM, C. A.; DA SILVA CARDEAL, L. B.; TIAGO, M.; SOENGAS, M. S.; DE MORAES BARROS, S. B.; MARIA-ENGLER, S. S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res*. 24 (1): 35-50. 2011.

BURDELYA, L. G.; KOMAROVA, E. A.; HILL, J. E.; BROWDER, T.; TARAROVA, N. D.; MAVRAKIS, L.; DICORLETO, P. E.; FOLKMAN, J.;

GUDKOV, A. V. Inhibition of p53 response in tumor stroma improves efficacy of anticancer treatment by increasing antiangiogenic effects of chemotherapy and radiotherapy in mice. *Cancer Res*. 66 (19): 9356-9361. 2006

CAPANOGLU, E.; BEEKWILDER, J.; BOYACIOGLU, D.; HALL, R.; DE VOS, R. Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. J. Agric. Food Chem. 56 (3): 964-973. 2008.

CASCALES A, SÁNCHEZ-VEGA B, NAVARRO N, PASTOR-QUIRANTE F, CORRAL J, VICENTE V, DE LA PEÑA FA. Clinical and genetic determinants of anthracycline-induced cardiac iron accumulation. *Int. J. Cardiol*. [Epub ahead of print] 2010.

CHEN, K. G.; VALENCIA, J. C.; LAI, B.; ZHANG, G.; PATERSON, J. K.; ROUZAUD, F.; BERENS, W.; WINCOVITCH, S. M.; GARFIELD, S. H.; LEAPMAN, R. D.; HEARING, V. J.; GOTTESMAN, M. M. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 103 (26): 9903-9907. 2006.

CHIANG, L. C.; CHIANG, W.; CHANG, M. Y.; NG, L. T.; LIN, C. C. Antileukemic activity of selected natural products in Taiwan. *Am. J. Chin. Med*. 31 (1): 37-46. 2003.

CHILDS, S.; LING, V. The MDR superfamily of genes and its biological implications. *Important Adv. Oncol.* 21-36. 1994.

CHIN, L.; GARRAWAY, L. A.; FISHER, D. E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*. 20 (16): 2149-2182. 2006.

CHU, Q. S.; FOROUZESH, B.; SYED, S.; MITA, M.; SCHWARTZ, G.; COOPER, J.; CURTRIGHT, J.; ROWINSKY, E. K. A phase II and pharmacological study of the matrix metalloproteinase inhibitor (MMPI) COL-3 in patients with advanced soft tissue sarcomas. *Invest. New Drugs*. 25 (4): 359-367. 2007.

CLARK, I. M.; SWINGLER, T. E.; SAMPIERI, C. L.; EDWARDS, D. R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (6-7): 1362-1378. 2008.

CONNORS, T. A. Alkylating agents. *Top. Curr .Chem*. 52: 141-171. 1974.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. N. Y. Acad.Sci.* 854: 435-442. 1998.

CUNNINGHAM, C. C. Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science*. 255: 325-327. 1992.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur. J. Cancer*. 36 (13): 1621-1630. 2000.

CURRIE, J. C.; FORTIER, S.; SINA, A.; GALIPEAU, J.; CAO, J.; ANNABI, B. Transporter expression in marrow stromal cells. MT1-MMP down-regulates the glucose 6-phosphate. *J. Biol. Chem*. 282 (11): 8142–8149. 2007.

CURTIN, J. A.; FRIDLYAND, J.; KAGESHITA, T.; PATEL, H. N.; BUSAM, K. J.; KUTZNER, H.; CHO, K. H.; AIBA, S.; BRÖCKER, E. B.; LEBOIT, P. E.; PINKEL, D.; BASTIAN, B. C. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N. Engl. J. Med*. 353 (20): 2135-2147. 2005.

DEICHMANN, M.; THOME, M.; EGNER, U.; HARTSCHUH, W.; KURZEN, H. The chemoresistance gene ABCG2 (MXR/BCRP1/ABCP1) is not expressed in melanomas but in single neuroendocrine carcinomas of the skin. *J. Cutan. Pathol*. 32 (7): 467-473. 2005.

DUC, Q.; BREETVELD, M.; MIDDELKOOP, E.; SCHEPER, R. J.; ULRICH, M. M.; GIBBS, S. A cytotoxic analysis of antiseptic medication on skin substitutes and autograft. *Br. J. Dermatol*. 157 (1): 33-40. 2007.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*. 2 (3): 161-174. 2002.

EL-AWADY, EL-S. E.; MOUSTAFA, Y. M.; ABO-ELMATTY, D. M.; RADWAN, A. Cisplatin-induced cardiotoxicity: Mechanisms and cardioprotective strategies. *Eur. J. Pharmacol.* 650 (1): 335-341. 2011.

EL-SAYYA, H. I.; ISMAIL, M. F.; SHALABY, F. M.; ABOU-EL-MAGD, R. F.; GAUR, R. L.; FERNANDO, A.; RAJ, M. H.; OUHTIT, A. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-flurouracil (5-FU) on the liver of male albino rats*. Int. J. Biol. Sci.* 5 (5): 466-473. 2009.

FACINO, R. M.; CARINI, M.; ALDINI, G.; SAIBENE, L.; PIETTA, P.; MAURI, P. Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of Echinacea extracts in the prevention of skin photodamage. *Planta Med*. 61 (6): 510-514. 1995.

FECHER, L. A.; AMARAVADI, R.; SCHUCHTER, L. M. Effectively targeting BRAF in melanoma: a formidable challenge. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21 (4): 410-401. 2008.

FELICIANI, C.; GUPTA, A.K.; SAUDER, D.N. Keratinocytes and cytokine/growth factors. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 7: 300-318. 1996.

FENG, R.; LU, Y.; BOWMAN, L. L.; QIAN, Y.; CASTRANOVA, V.; DING, M. Inhibition of activator protein-1, NF-kappaB, and MAPKs and induction of phase 2 detoxifying enzyme activity by chlorogenic acid. *J. Biol. Chem*. 280 (30): 27888-27895. 2005.

FERGUSON, L. R., HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur. J. Cancer Prevention*. 8 (1): 17-25. 1999.

FERNÁNDEZ, M. A.; SÁENZ, M. T.; GARCÍA, M. D. Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from Scrophularia frutescens. *J Pharm. Pharmacol.* 50 (10): 1183-1186. 1998.

FERNÁNDEZ, Y.; VERHAEGEN, M.; MILLER, T. P.; RUSH, J. L.; STEINER, P.; OPIPARI, A. W. JR.; LOWE, S. W.; SOENGAS, M. S. Differential regulation of NOXA in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res*. 65 (14): 6294-6304. 2005.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*. 3 (6): 453-458. 2003.

FORTIER, S.; LABELLE, D.; SINA, A.; MOREAU, R.; ANNABI, B. Silencing of the MT1-MMP/ G6PT axis suppresses calcium mobilization by sphingosine-1-phosphate in glioblastoma cells. *FEBS Lett.* 582: 799-804. 2008.

FRESHNEY, R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. p.117, Alan R. Liss, Inc., New York. 1987.

FUKUSHIMA, T.; TAKENOSHITA, S. Roles of RAS and BRAF mutations in thyroid carcinogenesis. *Fukushima J. Med. Sci*. 51 (2): 67-75. 2005.

GAGGIOLI, C.; SAHAI, E. Melanoma invasion – current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res*. 20: 161-172. 2007.

GALSKY, M. D.; IASONOS, A.; MIRONOV, S.; SCATTERGOOD, J.; BOYLE, M. G.; BAJORIN, D. F. Phase II trial of dose-dense doxorubicin plus gemcitabine followed by paclitaxel plus carboplatin in patients with

advanced urothelial carcinoma and impaired renal function. *Cancer*. 109 (3): 549-555. 2007.

GAMACHE, P.; RYAN, E.; ACWORTH, I. N. Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. *J. Chromatography*. 635 (1): 143-150. 1993.

GARBE, C.; EIGENTLER, T. K.; KEILHOLZ, U.; HAUSCHILD, A.; KIRKWOOD, J. M. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist.* 16 (1): 5-24. 2011.

GENTILHOMME, E.; REANO, A.; PRADEL, D.; BERGIER, J.; SCHMITT, D.; NEVEUX, Y. *In vitro* dermal intoxication by bis(chloroethyl)sulfide. Effect on secondary epidermization. *Cell Biol. Toxicol.* 14 (1): 1-11. 1998.

GERNER, R. E.; MOORE, G. E.; DICKEY, C. Combination chemotherapy in disseminated melanoma and other solid tumors in adults. *Oncology.* 31 (1): 22-30. 1975.

GHIBU, S.; DELEMASURE, S.; RICHARD, C.; GUILLAND, J. C.; MARTIN, L.; GAMBERT, S.; ROCHETTE, L.; VERGELY, C. General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid. *Biochimie*. [Epub ahead of print]. 2011.

GIOVANUCCI, E. Meta-analysis of coffee consumption of colorectal cancer. *J. Epidemiol.* 147: 1043-1052. 1998.

GIVAN, A. L. *Flow Cytometry: First Principles.* 2nd Edition. Wiley-Liss, Inc. ISBNs 0-471-38224-8, p. 123-125. 2001.

GLINSKY, G. V.; GLINSKY, V. V.; IVANOVA, A. B.; HUESER, C. J. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Lett*. 115 (2): 185-193. 1997.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 1152-1161. 2007.

GOTTLIEB, J. A.; DREWINKO, B. Review of the current clinical status of platinum coordination complexes in cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Rep*. 59 (3): 621-628. 1975.

GOYDOS, J. S.; MANN, B.; KIM, H. J.; GABRIEL, E. M.; ALSINA, J.; GERMINO, F. J.; SHIH, W.; GORSKI, D. H. Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma. *J. Am. Coll. Surg*. 200 (3): 362-370. 2005.

GRANADO-SERRANO, A. B.; MARTÍN, M. A.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; GOYA, L.; BRAVO, L.; RAMOS, S. Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *J. Agric. Food Chem*. 55 (5): 2020-2027. 2007.

GRUBER, B. M.; ANUSZEWSKA, E. L.; SKIERSKI, J. S. Activation of programmed cell death (apoptosis) by adriamycin in human neoplastic cells. *Mutat. Res.* 484 (1-2): 87-93. 2001.

GUPTA, S.; SAHA, B.; GIRI, A. K. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. *Mutat. Res*. 512 (1): 37-65. 2002.

HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc*. 10 (2): 153-163. 2005.

HAINAUT, P.; HOLLSTEIN, M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res*. 77: 81-137. 2000.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 35 (1-2): 7-20. 1995.

HERSEY, P.; ZHANG, X. D. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*. 1 (2): 142-150. Review. 2001.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 46 (2): 101-123. 2006.

HOFMANN, U. B.; HOUBEN, R.; BRÖCKER, E. B.; BECKER, J. C. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. *Biochimie*. 87 (34): 307-314. 2005.

HOFMANN, U. B.; WESTPHAL, J. R.; VAN MUIJEN, G. N.; RUITER, D. J. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 115 (3): 337-344. Review. 2000.

HOFMANN, U. B.; WESTPHAL, J. R.; WAAS, E. T.; ZENDMAN, A. J.; CORNELISSEN, I. M.; RUITER, D. J.; VAN MUIJEN, G. N. Matrix

metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br. J. Cancer*. 81 (5): 774-782.1999.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. *Archi. Toxicol. Suppl*. 20: 237-248. 1998.

HORCH, R. E.; KOPP, J.; KNESER, U.; BEIER, J.; BACH, A. D. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J. Cell Mol. Med.* 9: 592-608. 2005.

HORTOBÁGYI, G. N. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs*. 54 Suppl. 4: 1-7. 1997.

HOTARY, K.; ALLEN, E.; PUNTURIERI, A.; YANA, I.; WEISS S. J. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J. Cell Biol*. 149 (6): 1309-1323. 2000.

http://www.inca.gov.br/

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

HUANG, M. T.; LYSZ, T.; FERRARO, T.; ABIDI, T. F.; LASKIN, J. D.; CONNEY, A. H. Inhibitory effects of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Res*. 51 (3): 813-819. 1991.

HUANG, M. T.; SMART, R. C.; WONG, C. Q.; CONNEY, A. H. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*. 48 (21): 5941-5946. 1988.

HUNTINGTON, J. T.; SHIELDS, J. M. , DER, C. J.; WYATT, C. A.; BENBOW, U.; SLINGLUFF, C. L. JR.; BRINCKERHOFF, C. E. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J. Biol. Chem*. 279 (32): 33168-33176. 2004.

IBRAHIM, S. F.; BROWN, M. D. Tanning and cutaneous malignancy. *Dermatol. Surg*. 34 (4): 460-474. 2008.

INJAC, R.; STRUKELJ, B. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol. Cancer Res.Treat.* 7 (6): 497-516. 2008.

IOZZO, R. V. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 646-656. 2005.

IQBAL, S.; TSAO-WEI, D. D.; QUINN, D. I.; GITLITZ, B. J.; GROSHEN, S.; APARICIO, A.; LENZ, H. J.; EL-KHOUEIRY, A.; PINSKI, J.; GARCIA, A. A. Phase I clinical trial of pegylated liposomal Doxorubicin and docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Am. J. Clin. Oncol*. 34 (1): 27-31. 2011.

IVANOVA, A.; MILKOVA, T.; GALABOV, A. S.; NIKOLAEVA, L.; VOYNOVA, E. Transformation of cholanic acid derivatives into pharmacologically active esters of phenolic acids by heterogeneous Wittig reaction. *Zeitschrift fuer Naturforschung.* 52 (7-8): 516-521. 1997.

JENSEN, J. M.; PROKSCH, E. The skin's barrier. *G. Ital. Dermatol. Venereol*. 144 (6): 689-700. 2009.

JIN, C.; LI, H.; HE, Y.; HE, M.; BAI, L.; CAO, Y.; SONG, W.; DOU, K. Combination chemotherapy of doxorubicin and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 136 (2): 267-274. 2010.

KADOMA, Y.; FUJISAWA, S. A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method. *Molecules*. 13 (10): 2488-2499. 2008.

KÄHÄRI, V. M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann. Med*. 31 (1): 34-45. 1999.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol*. 12 (4): 390-399. 2002.

KATAOKA T, UMEDA M, SHIGETA T, TAKAHASHI H, KOMORI T. A new in vitro model of cancer invasion using AlloDerm, a human cadaveric dermal equivalent: a preliminary report. *Kobe J. Med. Sci*. 55 (5): E106-115. 2010

KERRY, N. L.; ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Atherosclerosi*s. 135 (1): 93-102. 1997.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J. Am. Diet. Assoc.* 99 (2): 213-218. 1999.

KOLARIĆ, K.; MARICIĆ, Z.; NOLA, P.; KRUSIĆ, J. Modified administration schedule of adriamycin in solid tumors. *Z. Krebsforsch Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol.* 88 (3): 255-260. 1977.

KOREN, G.; BEATTY, K.; SETO, A.; EINARSON, T. R.; LISHNER, M. The effects of impaired liver function on the elimination of antineoplastic agents. *Ann. Pharmacother.* 26 (3): 363-371. 1992.

KÜHBÖCK, J.; PEHAMBERGER, H.; MACH, K.; DIEM, E.; KOKOSCHKA, E. M.; PÖTZI, P. Treatment of metastatic malignant melanoma (author's transl). *Wien Klin. Wochenschr.* 90 (24): 856-858. 1978.

KURODA, Y.; HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat. Res*. 436 (1): 69-97. 1999.

LA PORTA, C. A. Drug resistance in melanoma: new perspectives. *Curr. Med. Chem*. 14 (4): 387-391. Review. 2007.

LA ROCCA, G.; PUCCI-MINAFRA, I.; MARRAZZO, A.; TAORMINA, P.; MINAFRA, S. Zymographic detection and clinical correlation of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Brit. J. Cancer.* 90 (7): 1414-1421. 2004.

LEDFORD, H. The roots of resistance. *Nature*. 468 (7323): 490. 2010.

LEE, W. J.; ZHU, B. T. Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols. *Carcinogenesis*. 27 (2): 269-277. 2006.

LEWINSKA, D.; PALUS, J.; STEPNIK, M.; DZIUBALTOWSKA, E.; BECK, J.; RYDZYNSKI, K.; NATARAJAN, A. T.; NILSSON, R. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 80 (5): 371-380. 2007.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2 (2): 329-333. 2007.

LIMA, D. R. *Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia*. Cap. 12. Oncologia. Medsi, RJ. 2004.

LIOTTA, L. A. Molecular biology of metastases: a review of recent approaches. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol*. 22 (3): 345-348. 1986.

LIU, D. P.; SONG, H.; XU, Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. *Oncogene*. 29 (7): 949-956. 2010.

LOCHTER , A.; SREBROW, A.; SYMPSON, C. J.; TERRACIO, N.; WERB, Z.; BISSELL, M. J. Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse

mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties. *J. Biol. Chem*. 272 (8): 5007-5015. 1997.

LOEFFEK, S.; ZIGRINO, P.; STEIGER, J.; KURSCHAT, P.; SMOLA, H.; MAUCH, C. Melanoma cell-derived vascular endothelial growth factor induces endothelial tubulogenesis within fibrin gels by a metalloproteinase-mediated mechanism. *Eur. J. Cell Biol.* 85 (11): 1167-1177. 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J. Biol. Chem*. 193 (1): 265-275. 1951.

LUNDQUIST, K.; KOHLER, S.; ROUSE, R. V. Intraepidermal cytokeratin 7 expression is not restricted to Paget cells but is also seen in Toker cells and Merkel cells. *Am. J. Surg. Pathol.* 23: 212-219. 1999.

MADHUNAPANTULA, S. V.; ROBERTSON, G. P. B-Raf a good therapeutic target for melanoma and other malignancies? *Cancer Res*. 68 (1): 5-8. Review. 2008.

MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol. Rev.* 83 (2): 337-376. 2003.

MARIA, S. S.; WADA, M. L. Cytochemical analysis of Vero cells on type I collagen gels in long-term culture. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 33 (10): 748-750. 1997.

MARSH, J. C. The effects of cancer chemotherapeutic agents on normal hematopoietic precursor cells: a review. *Cancer Res.* 36 (6): 1853-1882. 1976.

MARTI-MESTRES, G.; MESTRES, J. P.; BRES, J.; MARTIN, S.; RAMOS, J.; VIAN, L. The “in vitro” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. *International J. Pharmaceutics.* 331: 139-144. 2007.

MARTÍNEZ, R.; CHACÓN-GARCÍA, L.The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. *Curr. Med. Chem*.12 (2): 127-151. 2005*.*

MARUYAMA, K.; UNEZAKI, S.; TAKAHASHI, N.; IWATSURU, M. Enhanced delivery of doxorubicin to tumor by long-circulating thermosensitive liposomes and local hyperthermia. *Biochim. Biophys. Acta.* 1149 (2): 209-216. 1993.

MATTEI, S.; COLOMBO, M. P.; MELANI, C.; SILVANI, A.; PARMIANI, G.; HERLYN, M. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int. J. Cancer.* 56: 853-857. 1994.

MELNIKOVA, V. O; BAR-ELI, M. Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 22: 257-267. 2009.

MIURA, T.; CHIBA, M.; KASAI, K.; NOZAKA, H.; NAKAMURA, T.; TOSHIHIKO SHOJI, T.; KANDA, T.; OHTAKE, Y.; SATO, T. Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through mitochondrial pathway activation of caspase-3. *Carcinogenesis*. 29 (3): 585-593. 2008.

MOEHRLE, M.; DIETRICH, H.; PATZ, C.D.; HÄFNER, H. M. Sun protection by red wine? *J. Dtsch. Dermatol. Ges*. 7 (1): 29-32, 29-33. 2009.

MOLNÁR, E. L.; HEGYESI, H.; TÓTH, S.; DARVAS, Z.; LÁSZLÓ, V.; SZALAI, C.; FALUS, A. Biosynthesis of interleukin-6, an autocrine growth factor for melanoma, is regulated by melanoma-derived histamine. *Semin. Cancer Biol*. 10 (1): 25-28. 2000.

MORETTI, S.; PINZI, C.; SPALLANZANI, A.; BERTI, E.; CHIARUGI, A.; MAZZOLI, S.; FABIANI, M.; VALLECCHI, C.; HERLYN, M. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *Int. J. Cancer*. 84: 160-168. 1999.

MUELLER, M. M.; FUSENIG, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 4 (11): 839-849. Review. 2004.

MUGGIA, F. M.; GREEN, M. D. New anthracycline antitumor antibiotics. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 11 (1): 43-64. 1991.

MUNSTER, P. N.; MARCHION, D.; THOMAS, S.; EGORIN, M.; MINTON, S.; SPRINGETT, G.; LEE, J. H.; SIMON, G.; CHIAPPORI, A.; SULLIVAN, D.; DAUD, A. Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker. *Br. J. Cancer.* 101 (7): 1044-1050. 2009.

MYSLIWIEE, A. G.; ORNSTEIN, D. L. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer*. 1 (4): 208-219. 2002.

NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol. Int*. 52 (4): 255-264. 2002.

NAGAO, T.; ABE, F.; OKABE, H. Antiproliferative constituents in the plants 7. Leaves of *Clerodendron bungei* and leaves and bark of *C. trichotomum. Biol. Pharm. Bull.* 24 (11): 1338-1341. 2001.

NAGEN, T. J.; ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L. C. G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. *Arquivos de Biol. Tecnol.* 35 (1): 129-138. 1992.

NEALE, M. H.; MYATT, N. E.; KHOURY, G. G.; WEAVER, P.; LAMONT, A.; HUNGERFORD, J. L.; KURBACHER, C. M.; HALL, P.; CORRIE, P. G.; CREE, I. A. Comparison of the ex vivo chemosensitivity of uveal and cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 11 (6): 601-609. 2001.

NIKKOLA, J.; VIHINEN, P.; VLAYKOVA, T.; HAHKA-KEMPPINEN, M.; KÄHÄRI, V. M.; PYRHÖNEN, S. High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int. J. Cancer.* 97 (4): 432-438. 2002.

NTAYI, C.; HORNEBECK, W.; BERNARD, P. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in cutaneous melanoma progression. *Pathol. Biol.* 52: 154-159. 2004.

OLMOS, A.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; RIOS, J. L.; CERDÁ-NICOLÁS, J. M.; MÁÑEZ, S. Effects of plant alkylphenols on cytokine production, tyrosine nitration and inflammatory damage in the efferent phase of contact hypersensitivity. *Brit. J. Pharmacol*. 152: 366-373. 2007.

OSSOWSKI, L.; AGUIRRE-GHISO, J. A. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 23 (1): 41-56. Review. 2010.

PAQUET, P.; PIÉRARD, G. E. Soluble fractions of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and of their receptors in toxic epidermal necrolysis: a comparison with second-degree burns. *Int. J. Mol. Med*. 1 (2): 459-462. 1998.

PARK, H. J.; DAVIS, S. R.; LIANG, H. Y.; ROSENBERG, D. W.; BRUNO, R. S. Chlorogenic acid differentially alters hepatic and small intestinal thiol redox status without protecting against azoxymethane-induced colon carcinogenesis in mice. *Nutr. Cancer*. 62 (3): 362-370. 2010.

PAYNE, A. S.; CORNELIUS, L. A. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J. Invest. Dermatol*. 118 (6): 915-922. Review. 2002

PHILLIPS, T. J. New skin for old: developments in biological skin substitutes. *Arch. Dermatol.* 134: 344-349. 1998.

POLÁSEK, M.; PETRISKA, I.; POSPÍSILOVÁ, M.; JAHODÁR, L. Use of molybdate as novel complex-forming selector in the analysis of polyhydric phenols by capillary zone electrophoresis. *Talanta*. 69 (1): 192-198. 2006.

PONEC, M.; KEMPENAAR, J. Use of human skin recombinants as an *in vitro* model for testing the irritation potential of cutaneous irritants. *Skin Pharmacol*. 8 (1-2): 49-59. 1995.

POTTER, B. The physiology of the skin. *Annu. Rev. Physiol*. 28: 159-176. 1966.

PUCHES, R.; SMOLLE, J.; RIEGER, E.; SOYER, H. P.; KERL, H. Expression of cytoskeletal componentsin melanocytic skin lesions. An immunohistochemical study. *Am. J. Dermatopathol*. 13: 137-144. 1991.

RAKIB, M. A.; KIM, Y. S.; JANG, W. J.; CHOI, B. D.; KIM, J. O.; KONG, I. K.; HA, Y. L. Attenuation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced gap junctional intercellular communication (GJIC) inhibition in MCF-10A cells by c9,t11-conjugated linoleic acid. *J. Agric. Food Chem*. 58 (22): 12022-12030. 2010.

RAMOS, S.; ALÍA, M.; BRAVO, L.; GOYA, L. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Agric. Food Chem*. 53 (4): 1271-1280. 2005.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp. Cell Res.* 316: 2713-2722. 2010.

RÉGNIER, M.; CARON, D.; REICHERT, U.; SCHAEFER, H. Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis. *J. Pharm. Sci.* 82: 404-407. 1993.

RÉGNIER, M.; STAQUET, M. J.; SCHMITT, D.; SCHMIDT, R. Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 109: 510-512. 1997.

RICE-EVANS, C.; BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Progress in Lipid Res.* 32 (1): 71-110. 1993.

RICHMOND, A.; YANG, J.; SU, Y. The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 22: 175-186. 2009.

ROGUET, R. Use of skin cell cultures for *in vitro* assessment of corrosion and cutaneous irritancy. *Cell Biol. Toxicol.* 15 (1): 63-75. 1999.

ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; NETKE, S.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. In vivo and in vitro antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human melanoma cell line A2058. *In Vivo*. 20 (1): 25-32. 2006.

RUSSO, A.; PIOVANO, M.; LOMBARDO, L.; GARBARINO, J.; CARDILE, V. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sci.* 83: 468-474. 2008.

SCHITTEK, B.; PSENNER, K; SAUER, B.; MEIER, F.; IFTNER, T.; GARBE, C. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *Int. J. Cancer.* 120: 2110-2118. 2007.

SERRONE, L.; ZEULI, M.; SEGA, F. M.; COGNETTI, F. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 19 (1): 21-34. 2000.

SESSA, C.; ZUCCHETTI, M.; GHIELMINI, M.; BAUER, J.; D'INCALCI, M.; DE JONG, J.; NAEGELE, H.; ROSSI, S.; PACCIARINI, M. A.; DOMENIGONI, L.; CAVALLI, F. Phase I clinical and pharmacological study of oral methoxymorpholinyl doxorubicin (PNU 152243). *Cancer Chemother. Pharmacol.* 44 (5): 403-410. 1999.

SHEU, B. C.; LIEN, H. C.; HO, H. N.; LIN, H. H.; CHOW, S. N.; HUANG, S. C.; HSU, S. M. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res*. 63: 6537-6542. 2003.

SIGNORELLI, M.; LISSONI, A. A.; GARBI, A.; PEREGO, P.; MANGIONI, C. Primary malignant vaginal melanoma treated with adriamycin and ifosfamide: a case report and literature review. *Gynecol. Oncol.* 97 (2): 700-703. 2005.

SINGER, C. F.; KRONSTEINER, N.; MARTON, E.; KUBISTA, M.; CULLEN, K. J.; HIRTENLEHNER, K.; SEIFERT, M.; KUBISTA, E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially

regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res. Treat*. 72 (1): 69-77. 2002.

SIU, W. Y.; YAM, C. H.; POON, R. Y. G1 versus G2 cell cycle arrest after adriamycin-induced damage in mouse Swiss3T3 cells. *FEBS Lett.* 461 (3): 299-305. 1999.

SMALLEY, K. S. PLX-4032, a small-molecule B-Raf inhibitor for the potential treatment of malignant melanoma. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 11 (6): 699-706. Review. 2010.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr*. 15 (1): 71-81. 2002.

SOENGAS, M. S.; CAPODIECI, P.; POLSKY, D.; MORA, J.; ESTELLER, M.; OPITZ-ARAYA, X.; MCCOMBIE, R.; HERMAN, J. G.; GERALD, W. L.; LAZEBNIK, Y. A.; CORDÓN-CARDÓ, C.; LOWE, S. W. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*. 409 (6817): 207-211. 2001.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 22 (20): 3138-3151. 2003.

SPALLAROSSA, P.; ALTIERI, P.; GARIBALDI, S.; GHIGLIOTTI, G.; BARISIONE, C.; MANCA, V.; FABBI, P.; BALLESTRERO, A.; BRUNELLI, C.; BARSOTTI, A. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase. *Cardiovasc. Res*. 69 (3): 736-745. 2006.

STAUNTON, M. J.; GAFFNEY, E. F. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am. J. Clin. Pathol*. 103 (3): 300-307. 1995.

STONER, G. D.; MUKHTAR, H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J. Cell Biochem. Suppl*. 22: 169-180. 1995.

STORM, G.; ROERDINK, F. H.; STEERENBERG, P. A.; DE JONG, W. H.; CROMMELIN, D. J. Influence of lipid composition on the antitumor activity exerted by doxorubicin-containing liposomes in a rat solid tumor model. *Cancer Res*. 47 (13): 3366-3372. 1987.

STREKOWSKI ,L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. Mutat. Res. 623 (1-2): 3-13. 2007.

TADA, S.; HATOKO, M.; TANAKA, A, KUWAHARA, M.; MURAMATSU, T. EXPRESSION of desmoglein I and plakoglobin in skin carcinomas. *J. Cutan. Pathol*. 27: 24-29. 2000.

TAO, K. S.; WANG, W.; WANG, L.; CAO, D. Y.; LI, Y. Q.; WU, S. X.; DOU, K. F. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. *Med. Hypotheses*. 71 (5): 730-736. 2008.

TAVANI, A.; PREGNOLATO, A; LA VECCHIA, C.; NEGRI, E; TALAMINI, R.; FRANCESCHI, S. Coffee and tea intake and risk of cancers of colon and rectum. A study of 3.530 cases and 7.057 controls. *International J. Cancer*. 73: 193-196. 1997.

TIZNADO-OROZCO, T.; OREA-SOLANO, M. Dendritic cells and their role in atopic dermatitis. *Rev. Alerg. Mex.* 51(3): 119-123. 2004.

TOKER, C. Clear cells of the nipple epidermis. *Cancer* ; 25: 601-610. 1970.

TSUKAMOTO, H.; MISHIMA, Y.; HAYASHIBE, K.; SASASE, A. Alpha-smooth muscle actin expression in tumor and stromal cells of benign and malignant human pigment tumors. *J. Invest. Dermatol*. 98: 116-120. 1992.

WALKER, R. A.; WOOLLEY, D. E. Immunolocalisation studies of matrix metalloproteinases-1, -2 and -3 in human melanoma. *Virchows. Arch.* 435 (6): 574-579. 1999.

WEISZ, L.; DAMALAS, A.; LIONTOS, M.; KARAKAIDOS, P.; FONTEMAGGI, G.; MAOR-ALONI, R.; KALIS, M.; LEVRERO, M.; STRANO, S.; GORGOULIS, V. G.; ROTTER, V.; BLANDINO, G.; OREN, M. Mutant p53 enhances nuclear factor κB activation by tumor necrosis factor α in cancer cells. *Cancer Res*. 67 (6): 2396-2401. 2007.

WESTERMARCK, J.; ILVONEN, E.; KÄHÄRI, V. M. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid suppresses type I collagen gene expression in cultured fibroblasts at the transcriptional level. *Biochem. J*. 308 (Pt 3): 995-999. 1995.

WONG, T.; MCGRATH, J. A.; NAVSARIA, H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br. J. Dermatol.* 156: 1149-1155. 2007.

YAMADA, T.; SHINOHARA, K.; TAKEDA, K.; KAMEDA, N.; KATSUKI, K.; ARIYOSHI, K.; KAMEI, T. Second lung adenocarcinoma after combination chemotherapy in two patients with primary non-Hodgkin's lymphoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 29 (4): 226-228. 1999.

YIP, E. C.; CHAN, A. S.; PANG, H.; TAM, Y. K.; WONG, Y. H. Protocatechuic acid induces cell death in HepG2 hepatocellular carcinoma cells through a c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Cell Biol. Toxicol*. 22 (4): 293-302. 2006.

YOKOYAMA, M.; OKANO, T.; SAKURAI, Y.; EKIMOTO, H.; SHIBAZAKI, C.; KATAOKA, K. Toxicity and antitumor activity against solid tumors of micelle-forming polymeric anticancer drug and its extremely long circulation in blood. *Cancer Res*. 51 (12): 3229-3236. 1991.

ZESSNER, H.; PAN, L.; WILL, F.; KLIMO, K.; KNAUFT, J.; NIEWÖHNER, R.; HÜMMER, W.; OWEN, R.; RICHLING, E.; FRANK, N.; SCHREIER, P.; BECKER, H.; GERHAUSER, C. Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. *Mol. Nutr. Food Res*. 1: 28-44. 2008.

ZIGRINO, P.; LÖFFEK, S.; MAUCH, C. Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion. *Biochimie*. 87 (3-4): 321-328. Review. 2005.