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

Efeito do resveratrol e do 2-Metoxiestradiol em linhagens de melanoma humano em modelos de monocamada e de pele reconstituída

Renato Ramos Massaro

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Silvy Stuchi Maria Engler

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Massaro, Renato Ramos

M414e Efeito do resveratrol e do 2-metoxiestradiol em linhagens
de melanoma humano em modelos de monocamada e de pele
reconstituída / Renato Ramos Massaro. -- São Paulo, 2014.
145p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Engler, Silvy Stuchi Maria

1. Pele : Câncer 2. Melanoma 3. Pele artificial I. T. II. Engler,
Silvy Stuchi Maria, orientador.

616.9945 CDD

Renato Ramos Massaro

Efeito do Resveratrol e do 2-Metoxiestradiol em linhagens de melanoma humano em modelos de monocamada e de pele reconstituída

Versão Original

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^ª. Dr^a Silvyia Stuchi Maria Engler
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de 2014

*Aos meus pais
Sérgio Massaro e Sônia Maria Ramos Massaro
pelo apoio incondicional e compreensão*

AGRADECIMENTOS

Em todo trabalho desenvolvido, por mais que tentemos fazer tudo de forma independente (que fique claro que este não é o caso aqui), sempre dependemos de algumas pessoas direta ou indiretamente. No meu caso, eu fiz questão de aproveitar o máximo das pessoas que estavam à minha volta para tornar o desenvolvimento deste trabalho mais agradável e melhorar a qualidade deste. Dessa forma, agradeço todos os que interagiram comigo nestes últimos quatro anos e meio, cientificamente ou não, pois graças a vocês consegui completar esta etapa e me tornar a pessoa que sou hoje.

Agradeço especialmente a minha orientadora Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler. Durante o tempo que estive no laboratório ela esteve no exterior, eu estive no exterior, e independente da distância, sua dedicação, atenção e disponibilidade sempre foram notórias. Agradeço muitíssimo a paciência comigo, e a liberdade de seguir alguns caminhos que muitas vezes eram um tanto quanto dispersos. Agradeço a oportunidade que me deu de fazer Doutorado Sanduiche nos Estados Unidos. Agradeço muito a oportunidade que me deu de ensinar e me responsabilizar por uma aluna de iniciação científica, a Mariana Bartié. Agradeço principalmente ter acreditado na minha capacidade de desenvolver um projeto de doutorado, a insistência em querer me ensinar caminhos que muitas vezes a minha cabeça-dura não queria me deixar ver, e quero deixar claro que esse ensino foi muito importante para mim tanto no âmbito científico como no pessoal. Em novembro foram completados 10 anos que estou sob sua orientação, e agradeço a competência com a qual ela conduziu meu trabalho. Foi uma honra ter feito iniciação científica, mestrado e doutorado sob sua orientação. Hoje vejo que todas as discussões científicas, cobranças e até brigas não foram nada além de preocupação em tornar seu aluno um cientista e uma pessoa melhor. Muito obrigado.

À Prof. Silvia Berlanga de Moraes Barros por ser minha madrinha científica e acreditar no meu trabalho durante este tempo que estive no laboratório. Por ter dado todo o suporte e ajuda na ausência da Silvy. Por

todas as discussões e um olhar experiente e diferencial sobre o meu trabalho. Pelas cobranças e preocupação com o meu desenvolvimento científico.

Ao Dr. Keiran Smalley por ter me dado a oportunidade de fazer meu Doutorado Sanduiche sob sua orientação, por ter me dado chance de trabalhar com outros projetos e com aspectos diferentes do melanoma, por ter me incentivado a participar de aulas, congressos e simpósios no tempo que eu estive no Moffitt Cancer Center and Research Institute. A convivência científica e pessoal e a interação com o seu grupo de pesquisa foi essencial para a minha formação e para o desenvolvimento do meu doutorado.

À minha banca de qualificação do doutorado: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi e Profa. Dra. Soraya Soubhi Smaili, vocês contribuíram muito para balizar e tornar este trabalho o que ele é hoje.

À minha banca de defesa de doutorado por lerem meu trabalho e contribuírem com comentários para a elaboração final.

Aos meus companheiros de laboratório, desde minha chegada há 10 anos. Alguns ficaram por menos tempo, outros por mais, mas todos contribuíram para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Aos que já saíram do laboratório, Cristina Dislich Ropke, Tania Cristina Higashi Sawada, Paula Anastácia Ferreira, Vanessa Vitoriano da Silva, Daniela Dayrell França, Fabriciano Pinheiro, Elisângela Monteiro Pereira, Diogo Pineda Rivelli, Rebeca Leite de Almeida, Tatiana Caroline Silveira Correa, Laura da Silva Cardeal, Carla Abdo Brohem, Erika Regina Matheus, Raquel Brandão Haga, Fernanda Branco Fillipin, Rafael Duarte Paes, Mariana Bartié (a melhor aluna de iniciação científica do mundo), Vitor Castro, Taissa Mattos, Marina Gutierrez, Andréa Mendez Araújo, Patricia Baltrukonis Bucci Casari, Maria Clara Araújo Crepaldi, Kaio Vitzel, Mariana Figueiredo de Moura, Natalia Tamachiro, Denise Varella Miranda, Carolina Benevenuto e Thalita Zanoni. Aos que continuam no laboratório, Andréa Costa Fruet, Kely Medeiros Turra, Bianca Ferrucio, Fernanda Faião Flores, Michelle Garcia Discacciati de Carvalho, Silvana Sandri, Tatiana do Nascimento Pedrosa, Débora Kristina Magalhães Alves, Paula Comune Pennacchi, Manoela Tiago dos Santos, Carolina Motter

Catarino, Octávio Luís Alves Gomes, Gustavo Takashi Ikeda, Garcia Pereira de Souza e Nayane de Souza. Obrigado a todos por tornar cada dia de trabalho mais agradável.

Aos meus companheiros de laboratório no tempo que eu estive no exterior, Kim Paraiso, Eirik Haarberg, Sarah Slooth, Manali Phadke, Gretchen Alicea, Inna Fedorenko e especialmente ao Vito Rebecca, com quem eu desenvolvi grande parte do meu projeto e que me ajudou em cada etapa que eu estive no exterior.

Às técnicas Clarissa Kera, Elaine Augusto, Silene Migliorini, Camila Marinho e Silvia Romano pela prestatividade, eficiência e por tornar meu trabalho no laboratório muito mais organizado e leve. Sem elas, nem metade deste trabalho teria sido realizado.

Agradeço em especial à Carla, Laura, Rebeca, Diogo e Tati por serem meus mentores no laboratório enquanto estavam por lá. Muito do que eu aprendi foi com eles, principalmente com a Tati, que foi minha chefinha por toda minha iniciação científica. Agradeço muito a vocês por todas as discussões, análises críticas, carinho, amizade incondicional, incentivo e, claro, a paciência de vocês em me ensinar o que sei hoje.

Aos cientistas Alice, Carla, Danilo, Gabriela, Joana, Mônica e Tatiana, por me incentivarem e compartilharem histórias e dificuldades comigo. Ter vocês do meu lado neste caminho foi muito importante.

Aos meus amigos. Eu tenho a sorte de ter muitos e tenho medo de esquecer de colocar aqui o nome de alguém aqui, então não vou citá-los. Todos vocês foram muito importantes para mim e para a manutenção da minha sanidade mental durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço todos do departamento de análises clínicas e toxicológicas, acho que neste período utilizei todos os laboratórios, sem exceção. Muitos de vocês se tornaram meus amigos ao longo desta jornada de 10 anos. Agradeço aos professores, alunos e agregados que, seja nos corredores desejando um bom dia, ou na bancada ajudando na realização de experimentos, ajudaram no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço em especial a Profa. Ana Campa e

seus alunos por estarem sempre disponíveis para ajudar em todo e qualquer assunto. Sinto como se este laboratório fosse uma extensão do nosso.

À minha família pelo apoio e incentivo incondicional. Aos meus pais por todo o amor e carinho. Pai e mãe, graças a vocês eu tive condições de fazer algo que eu amo, e sou grato todos os dias por ter o apoio, paciência (muita mesmo) e amor incondicional de vocês. Aos meus irmãos Ric e Edu por servirem de exemplo para mim, quando eu crescer quero ser igual a vocês. À Luzia, que cuida de mim e me mimar desde os meus 2 anos de idade. Ao tio Poli, tia Heli e meu primo Daniel, muito obrigado por todo o incentivo. Ao Guto por abanar sua cauda e fazer festa para mim sempre que eu chego em casa.

À Gisela Ramos do laboratório de histotécnica do ICB-USP pela paciência em me ensinar a usar o micrótomo.

À Profa. Betina Malik do IQ-USP e seus alunos por permitirem que eu utilizasse seu microscópio de fluorescência invertido.

Às secretarias do departamento Ana, Dora, Edna e Suely; e à secretaria de pós-graduação, Elaine, Jorge e Miriam. À Rose e Claudinha e todos os funcionários da FCF-USP. Vocês não fazem idéia do quanto facilitaram a minha vida, o trabalho de todos vocês foi essencial para que eu pudesse desenvolver o meu.

À CNPq, FAPESP, CAPES e PRP-USP pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento do meu trabalho.

“The universe is under no obligation to make sense to you”

Niel deGrasse Tyson

RESUMO

MASSARO, R.R. **Efeito do Resveratrol e do 2-Metoxiestradiol em linhagens de melanoma humano em modelos de monocamada e de pele reconstituída.** 2014. 180f. (Tese de Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013

Os melanomas são o tipo mais mortal de câncer de pele, apesar da baixa incidência, 80% das mortes de câncer de pele são devidas ao melanoma metastático. Novas abordagens farmacológicas e a busca por novos compostos para a terapêutica do melanoma, em aplicações isoladas ou em combinação com outros fármacos é imprescindível. Esta busca ocorre principalmente no campo das terapias de alvos específicos, devido à aquisição de resistência tumoral e recidiva. O resveratrol (RES) é um polifenol com atividade anti-oxidante, e seu efeito anti-tumoral foi mostrado pela indução de morte celular, porém o seu estudo não foi aprofundado pela inviabilidade do uso de altas doses *in vitro* para observação de efeitos celulares. Outro composto, o 2-metoxiestradiol (2ME) é um metabólito do estrógeno cujo efeitos anti-câncer já foi demonstrado em melanoma, porém sem elucidação das vias de sinalização envolvidas. O efeito em células com resistência adquirida também nunca foram testados. Neste estudo ampliamos o painel de linhagens celulares de melanoma humano, e demonstramos que o 2ME induz morte celular, inibe a proliferação destas células sendo que esta inibição está associada a indução de senescência. Pela primeira vez foi observada a inibição de proliferação pelo 2ME em células com a mutação BRAF V600E resistentes ao vemurafenibe (inibidor de BRAF) e duplo resistentes ao vemurafenibe e trametinibe (inibidor de MEK). A inibição de proliferação foi acompanhada pela modulação de p21^{Cip1}, Ciclina B1, pRb, proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular. A exposição prolongada ao 2ME inibiu a formação de colônias em todas as linhagens de melanoma (não resistentes e resistentes), mas não teve o mesmo efeito em fibroblastos primários, mostrando efeito seletivo. Em modelo tridimensional de esferóides, foi observado que as linhagens resistentes (Sk-Mel-28R) e duplo resistentes (Sk-Mel-28RT) são mais invasivas que a parental (Sk-Mel-28). Neste modelo, o 2ME foi capaz de inibir a invasão e viabilidade destas células. No modelo de pele reconstituída, na ausência de tratamento, observa-se invasão das células de melanoma pela derme, porém este fenômeno é diminuído quando as peles são tratadas com 2ME. Estes resultados demonstram que o 2ME é um efetivo agente anti-melanoma, independente de sua resistência.

Palavras chave: **Resveratrol, 2-Metoxiestradiol, melanoma e pele reconstituída.**

ABSTRACT

MASSARO, R.R. **Effects of Resveratrol and 2-Methoxyestradiol in human melanoma cell lines in monolayer and skin reconstruct models.** 2014. 180f. (Tese de Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013

Melanomas are the deadliest type of skin cancer, and in spite of the low incidence, 80% of the skin cancer associated death cases are due to metastatic melanoma. New pharmacological approaches and the search of new compounds for melanoma therapeutics, for monotherapy or combination therapy, are essential. This search occurs mainly in the targeted therapy field because of the melanoma acquisition of resistance to the current treatments. Resveratrol (RES) is a polyphenol with anti-oxidant activity, and its anti-tumor effect has been shown through the induction of cell death. However, the study of this compound has been discontinued in this work due to the impossibility of using high doses *in vitro* for the observation of cellular effects. Another compound, 2-methoxyestradiol (2ME) is a metabolite from estrogen, and its anti-cancer effects has already been shown in melanoma, but with no elucidation of the signaling pathways involved. Furthermore, the effects in cells with acquired resistance have never been shown. In this study we used a broader panel of human melanoma cell lines and demonstrated that 2ME induces cell death, inhibits proliferation of these cells, and this inhibition is associated with the induction of cell senescence. The inhibition of proliferation caused by 2ME was observed for the first time in BRAF V600E cells that are resistant to Vemurafenib (BRAF inhibitor) and double resistant to Vemurafenib and Trametinib (MEK inhibitor). The proliferation inhibition was related to the modulation of p21^{Cip1}, Cyclin B1 and pRb, which are proteins involved in cell cycle regulation. Long exposure to 2ME in colony formation assay showed the inhibition of colony in all melanoma cell lines (regardless of resistance and mutational status), but not in primary fibroblasts, showing selective effect. In three-dimensional spheroid model, it was observed that the resistant (Sk-Mel-28R) and double-resistant (Sk-Mel-28RT) cell lines were more invasive than the parental cell line (Sk-Mel-28). In this model, 2ME was able to inhibit cell invasion and cell viability. In the skin reconstruct model, in the absence of treatment, melanoma cell invasion can be observed in the dermis layer. However, after the treatment with 2ME these cell invasion foci are inhibited. Altogether, these effects demonstrate that 2ME is an effective anti-melanoma agent, regardless of resistance.

Key words: Resveratrol, 2-Methoxyestradiol, melanoma and reconstructed skin.

LISTA DE ABREVIATURAS

2ME	2-metoxiestradiol
3MA	3-metiladenina
5FU	5-fluorouracil
ABC	ATP-Binding Cassette
ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B member 1
AKT	Também conhecido como PKB (Protein kinase B), regulador crítico da sobrevivência celular e proliferação
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ATG5	Autophagy protein 5 ou Proteína autofágica 5, proteína necessária para a elongação do autofagossomo
BAD	Bcl-2 associated death promoter, um fator pró-apoptótico
Baf	Bafilomicina A1, um inibidor de autofagia
Bax	Bcl-2 associated X protein ou Proteína X associada ao Bcl-2, um fator pró-apoptótico que antagonize a proteína Bcl-2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, um fator anti-apoptótico
Bcl-xl	B-cell lymphoma extra large, molécula transmembrana presente na mitocôndria que funciona como fator anti-apoptótico
BIM	Também conhecido como BCL2L11, Bcl-2 like protein 11, um fator pró-apoptótico
BRAF	Gene que traduz a proteína B-Raf, que faz parte da família Raf kinase

BrdU	Bromodeoxyuridine ou Bromodeoxiuridina
BSC	Basal Cell Carcinoma ou Carcinoma Basocelular
Cdc2	Cell division cycle protein 2, também conhecida como CDK1 ou p34cdc2
Cdc25	Cell division cycle protein 25 ou proteína 25 relacionada ao ciclo de divisão celular, ativa Cdk's pela desfosforilação
Cdk	Ciclin dependent kinase ou cinase dependente de ciclina
cDNA	DNA complementar, sintetizado a partir de um mRNA
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 ou proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, corante fluorescente que se liga a regiões do DNA ricas em A-T
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Desoxiribonucleic Acid ou Ácido Desoxiribonucleico
DR5	Death receptor 5 ou receptor de morte 5
DTT	Molécula redutora chamada ditioneitol
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinases ou Cinases Reguladas por Sinalização Extracelular, proteínas da cascata de sinalização de MAPK
FDA	Food and Drug Administration
FTI	Farnesyltransferase Inhibitor ou Inibidor de Farnesiltransferase
H3K9me3	Histona H3 trimetilada na lisina 9
Hedgehog	Via de sinalização chave para o desenvolvimento embrionário

HMB45	Human melanoma black 45, anticorpo que reage com antígeno presente em melanomas melanocíticos
GFP	Green Fluorescent Protein ou Proteína Fluorescente Verde
HE	Hematoxilina-Eosina
HIF-1 α	Hipoxia inducible factor 1 α ou fator 1 α induzido por hipóxia
IC50	Concentração de inibição de 50% da inibição máxima
IFN α	Interferon α
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor ou receptor do fator de crescimento 1 do tipo insulina
IL-2	Interleukin-2 ou Interleucina-2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JNK	c-Jun N-terminal kinase ou cinases c-Jun n-terminal
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3, pode estar em sua forma citosólica (LC3-I) ou conjugada com fosfatidiletanolamina (LC3-II)
MAPK	Mitogen activated protein kinase – Proteínas cinase ativadas por sinal mitogênico
Mcl-1	Fator da família Bcl-2 que inibe apoptose, conhecido como induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MDR	Multiple drug resistance ou resistência a múltiplas drogas
MDR1	Multiple Drug Resistance protein 1 ou ABCB1
MEK	Proteínas cinase da via de MAPK
MelanA	Também conhecido como MART-1 (Melanoma antigen recognized by T-cells 1, ou Antígeno 1 do melanoma

	reconhecido pelas células T)
MitF	Microphthalmia-associated transcription factor ou fator de transcrição associado a microftalmia
MM	Malignant Melanoma ou Melanoma Maligno
MTA	Microtubules targeting agents ou compostos que atuam nos microtúbulos
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de (3- (4,5- dimetiltiazol – 2-il) -2,5 difeniltetrazólio
NOXA	Latim para dano, proteína pró-apoptótica também conhecida como PMAIP1 (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)
NRAS	Gene da família RAS que codifica a proteína N-Ras (N por sua identificação inicial em Neuroblastoma)
p21/Cip1	Cdk interacting protein 1 ou proteína 1 que interage com CDK, é um inibidor de cinases dependentes de ciclina
p27/KIP1	CDK inhibitor 1B ou inibidor de cinase dependente de ciclina 1B
p31/comet	Inibidor de SAC (ponto de checagem da mitose)
p34cdc2	também conhecida como Cdc2
p38	p38 mitogen-activated protein kinase ou proteínas cinases p38 ativadas por sinal mitogênico, são proteínas responsivas a estímulos de estresse
p53	Proteína que regula o ciclo celular e reparo de DNA e morte celular por apoptose
p62/SQTM1	Proteína adaptadora que se liga a ubiquitina e pode regular a ativação de NFkB1

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis ou Eletroforese em gel de poliacrilamida
PARP	Poly ADP ribose polymerase ou polymerase poli ADP ribose, proteína envolvida em reparo de DNA e morte celular programada
PBS	Phosphate saline buffer ou Tampão fosfato salino
PD-1	Programmed Death – 1 (Receptor) ou Morte Programada - 1
PD-L1	Programmed Death – Ligant 1 ou Ligante de Morte Programada - 1
PI	Propidium iodide ou iodeto de propídeo
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, família de proteínas envolvidas em funções celulares como crescimento, proliferação diferenciação, tráfego de vesículas, e motilidade
PTEN	Phosphatase and tensin homolog, regula negativamente a via de sinalização de AKT
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis ou modulador de apoptose supra-regulado por p53, é um fator pró-apoptótico
PVDF	Polyvinylidene fluoride ou Fluoreto de polivinilideno
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, gene que codifica proteínas da família Raf, envolvidas na cascata de MAPK
RAS	Rat sarcoma, gene que codifica proteínas da família Ras, envolvidas na via de crescimento celular, diferenciação e sobrevivência
Rb	Retinoblastoma protein ou proteína do retinoblastoma é uma proteína supressora de tumor que desregulada em tumores
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors ou critérios de

	avaliação de respostas em tumores sólidos
RES	Resveratrol
RNA	Ribonucleic Acid – Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
ROC-1	Regulator of Cclins-1 ou Regulador de culinas-1
SAC	Spindle Assembly Checkpoint ou ponto de checagem de ligação à fibra do fuso
SBF	Soro Bovino Fetal
SCC	Squamous Cell Carcinoma – Carcinoma Espinocelular
SDS	Sodium dodecyl sulfato ou Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superoxide dismutase
TMRM	Tetrametil rodamina metil ester
VEGF	Vascular epithelial growth factor ou fator de crescimento de epitélio vascular
Wee1	Cinase nuclear que fosforila Cdk1, inibindo-a
Wnt	Via de sinalização conservada evolutivamente que regula aspectos da célula durante o desenvolvimento embrionário

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resumo de vias de sinalização importantes no melanoma e em sua progressão, mostrando as proteínas mais frequentemente mutadas (marcação com estrelas). Figura modificada de (Smalley, 2010) com dados de (Nikolaou <i>et al.</i> , 2012).	11
Figura 2	Culturas de A) FP#30 – Fibroblastos B) MP#30 – Melanócitos C) KP#30 – Queratinócitos após separadas. Aumento de 100x. D) FP#30 – Fibroblastos E) MP#30 – Melanócitos F) KP#30 – Queratinócitos após separadas. Aumento de 400x	15
Figura 3	Linhagens celulares de melanoma humano metastático que contém a proteína BRAF V600E. Coluna da esquerda, células parentais. Coluna central, células resistentes ao PLX4032. Coluna da direita, Células duplo-resistentes ao PLX4032 e Trametinib. Magnificação de 100X.	27
Figura 4	Crescimento de colônias de células da linhagem de melanoma humano #9 em durante diferentes períodos de tempo, para padronização do ensaio clonogênico.	29
Figura 5	Diferentes protocolos de tratamento das células com os compostos. A – sem renovar o meio de cultura contendo os compostos. B – Renovando o meio de cultura contendo os compostos 7 dias após o primeiro tratamento.	30
Figura 6	Imunofluorescência das linhagens de melanoma humano metastático indicadas realizadas com os anticorpos MelanA, MitF e HMF45. Notar a eficiência do anticorpo anti-MelanA na marcação de todas as linhagens celulares utilizadas, mostrando sua possível utilização para a identificação de melanomas nos ensaios futuros a serem realizados com a pele reconstituída. Fotografias adquiridas com magnitude	32

	de 200X.	
Figura 7	Pele artificial reconstituída tratada com veículo (A e C) e 2ME na concentração de 5 μ M (B e D). Em ambos os casos é possível observar a diferenciação da epiderme em diversas camadas, desde a camada basal até a camada córnea.	34
Figura 8	Estrutura química do Resveratrol	35
Figura 9	Citotoxicidade do Resveratrol em linhagens de queratinócito imortalizadas HaCaT.	39
Figura 10	Efeito dose dependente do 2ME nas células primárias e linhagens de melanoma humano após 24h 48h e 72h.	40
Figura 11	Efeito tempo dependente do RES nas células primárias e linhagens de melanoma humano.	41
Figura 12	Fotos das células primárias e de melanoma Sk-Mel-19 tratadas com o composto 2-metoxiestradiol por 72h na concentração de 100 μ M. Aumento de 100x.	43
Figura 13	Fotos das células primárias e de melanoma Sk-Mel-28 Sk-Mel-103 Sk-Mel-147 e Sk-Mel-173 tratadas com o composto Resveratrol por 72h na concentração de 100 μ M. Aumento de 100x.	44
Figura 14	Dot-plot das células marcadas com Anexina-APC e PI e submetidas a citometria de fluxo após tratamento com RES nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M por 48h e 72h.	45
Figura 15	Histograma da quantificação dos eventos mostrados no Dot-plot da citometria de fluxo das células de melanoma Sk-Mel-103 tratadas por 48h (A) e 72h (B)	46

	com RES nas concentrações de 50µM e 100µM.	
Figura 16	Imunoblotting da proteína que participa da vida apoptótica Caspase-9, na linhagem de melanoma Sk-Mel-103 após tratamento com RES por 48h e 72h.	47
Figura 17	Crescimento de colônias de fibroblastos primários e linhagens de melanoma humano após tratamento com RES nas concentrações indicadas.	48
Figura 18	Quantificação do número de colônias formadas em uma das replicatas dos ensaios de formação de colônias.	49
Figura 19	Efeito do RES administrado nas concentrações acima indicadas no número total de células após 24h, 48h e 72h de exposição ao composto.	50
Figura 20	Número total de células nas diferentes culturas primárias e linhagens de melanoma humano após tratamento com RES nas diferentes concentrações por 24h, 48h e 72h.	51
Figura 21	Estrutura química do 2-Methoxiestradiol	52
Figura 22	Efeito citotóxico do 2-ME em células primárias e de melanoma por MTT.	55
Figura 23	Ensaio sem replicatas da citotoxicidade do 2ME com concentrações superiores a 10µM, mostrando um aumento da densidade ótica não condizente com a quantidade de células observadas nas placas, justificando o uso de 10µM como concentração máxima de 2ME nos experimentos seguintes.	56
Figura 24	Citotoxicidade do 2ME no queratinócito imortalizado HaCaT.	57

Figura 25	Efeito dose dependente do 2ME nas células primárias e linhagens de melanoma humano após 24h 48h e 72h.	58
Figura 26	Efeito tempo dependente do 2ME nas células primárias e linhagens de melanoma humano.	59
Figura 27	Fotos das células primárias e de melanoma Sk-Mel-19 tratadas com o composto 2-metoxiestradiol por 72h na concentração de 10µM. Aumento de 100x.	60
Figura 28	Fotos das células primárias e de melanoma Sk-Mel-28, Sk-Mel-103, Sk-Mel-147, e Sk-Mel-173 tratadas com o composto 2-metoxiestradiol por 72h na concentração de 10µM. Aumento de 100x.	61
Figura 29	Crescimento de colônias de fibroblastos primários e linhagens de melanoma humano após tratamento com 2ME nas concentrações indicadas.	62
Figura 30	Quantificação do número de colônias formadas em uma das replicatas dos ensaios de formação de colônias.	63
Figura 31	Crescimento de colônias de diferentes linhagens de melanoma humano após tratamento com 2ME nas concentrações indicadas.	64
Figura 32	Crescimento de colônias de diferentes linhagens de melanoma humano resistente ou duplo resistente após tratamento com 1,0µM de 2-ME.	65
Figura 33	Efeito do 2ME administrado nas concentrações acima indicadas no número total de células após 24h, 48h e 72h de exposição ao composto.	65
Figura 34	Número total de células nas diferentes culturas primárias e linhagens de melanoma humano após	67

	tratamento com 2ME nas diferentes concentrações por 24h, 48h e 72h.	
Figura 35	Curvas de crescimento e tempos de dobramentos das linhagens de melanoma humano indicadas após tratamento com 2ME nas concentrações de 0,5µM e 1µM.	68
Figura 36	Gráficos da inibição de proliferação verificados por ensaio de Alamar Blue, após tratamento das linhagens indicadas com 2ME por 3 dias, 5 dias e 7 dias.	70
Figura 37	Gráficos da inibição de proliferação (preto) e suas curvas ajustadas ou <i>fit curves</i> (vermelho), após tratamento das linhagens indicadas com 2ME por 3 dias, 5 dias e 7 dias.	71
Figura 38	Gráficos da inibição de proliferação de linhagens de melanoma humano com a substituição NRAS Q16R após tratamento com 2ME por 3 dias.	72
Figura 39	Dot-plot das células marcadas com Anexina-APC e PI e submetidas a citometria de fluxo após tratamento com 2ME na concentração de 10µM por 48h e 72h.	73
Figura 40	Histograma da quantificação dos eventos mostrados no Dot-plot da citometria de fluxo das células de melanoma #9 tratadas por 48h (A) e 72h (B) com 2ME na concentração de 10µM.	74
Figura 41	Análise da indução de apoptose por marcação com Anexina V e TMRM (despolarização de membrana mitocondrial) após tratamento com as doses indicadas de 2ME por 5 dias.	75
Figura 42	Western blotting após 3 dias de tratamento com 2ME.	77
Figura 43	Western blotting após 5 dias de tratamento com 2ME.	77

Figura 44	Western blotting após 7 dias de tratamento com 2ME.	78
Figura 45	Western blotting após 7 dias de tratamento com 2ME.	78
Figura 46	Linhagem de melanoma humano Sk-Mel-103 transfectada com GFP-LC3 sob microscopia invertida após tratamento com 2ME nas condições indicadas, mostrando a formação de vacúolos autofágicos. Aumento 160X.	80
Figura 47	Linhagem de melanoma humano Sk-Mel-103 após tratamento com 2ME nas condições indicadas, e incubadas com o corante <i>Acridine Orange</i> , mostrando a formação de vesículas ácidas em vermelho. Controle sem tratamento fotografado após 72h. Aumento 100X.	81
Figura 48	Western Blotting da proteína LC3 em linhagem de melanoma Sk-Mel-103 após 72h de tratamento nas condições indicadas, mostrando as duas isoformas da proteína: citoplasmática (LC3-I) e lipídada (LC3-II).	82
Figura 49	Western Blotting para a proteína p62/SQTM1 em diferentes linhagens de melanoma humano tratadas com as concentrações indicadas de 2ME por 3 dias.	83
Figura 50	Western Blotting para as proteínas Beclin-1, LC3 e ATG-5 em diferentes linhagens de melanoma humano tratadas com as concentrações indicadas de 2ME por 3 dias.	84
Figura 51	Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h de tratamento com o 2ME.	85
Figura 52	Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 48h de tratamento com o 2ME.	86

Figura 53	Gráfico de barras representando as populações de células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, após diferentes tratamentos por 24h.	87
Figura 54	Gráfico de barras representando as populações de células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, após diferentes tratamentos por 48h.	87
Figura 55	Western Blotting de proteínas relacionadas à transição G2/M do ciclo celular em linhagens de melanoma humano tratadas com 1,0µM de 2ME pelos tempos indicados.	88
Figura 56	Western Blotting de proteínas relacionadas à transição G2/M do ciclo celular em linhagens de melanoma humano tratadas com as concentrações indicadas por 5 dias.	89
Figura 57	Western Blotting de ERK e pERK em linhagens de melanoma humano tratadas com 1,0µM de 2ME pelos tempos indicados.	91
Figura 58	Células das linhagens indicadas cultivadas por 5 dias na presença ou ausência de 1,0µM de 2ME coradas para β-galactosidase associada à senescência. Aumento 160X.	92
Figura 59	Western blotting para a proteína Histona H3 trimetilada na lisina 9 (H3K9me3) em células tratadas por 3 dias com 2ME nas concentrações indicadas.	93
Figura 60	Western blotting para a proteína Histona H3 trimetilada na lisina 9 (H3K9me3) em células tratadas com 1,0µM de 2ME nos tempos indicados	94
Figura 61	Células das linhagens indicadas cultivadas por 5 dias na presença de 0,5µM, 1,0µM ou 2,0µM de 2ME e	95

	depois por mais 3 dias na presença (fotos superiores) ou ausência (fotos inferiores) deste composto, e então coradas para β -galactosidase associada à senescência.	
Figura 62	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-28 após 3 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho - Actina.	97
Figura 63	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-28 após 3 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25 μ m.	97
Figura 64	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-28 após 5 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina.	98
Figura 65	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-28 após 5 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25 μ m.	98
Figura 66	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-103 após 3 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina.	99
Figura 67	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-103 após 3 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25 μ m.	99
Figura 68	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da	100

	tubulina na linhagem Sk-Mel-103 após 5 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho - Actina	
Figura 69	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-103 após 5 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25µm	100
Figura 70	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-147 após 3 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina.	101
Figura 71	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-147 após 3 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25µm	101
Figura 72	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-147 após 5 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina	102
Figura 73	Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-147 após 5 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25µm	102
Figura 74	Esferóides da linhagem Sk-Mel-28 tratados com concentrações de 1,0µM e 5,0µM de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).	103
Figura 75	Esferóides da linhagem Sk-Mel-103 tratados com concentrações de 1,0µM e 5,0µM de 2ME e coradas	104

	para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).	
Figura 76	Esferóides da linhagem Sk-Mel-147 tratados com concentrações de 1,0 μ M e 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).	105
Figura 77	Esferóides da linhagem Sk-Mel-173 tratados com concentrações de 1,0 μ M e 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).	106
Figura 78	Quantificação da fluorescência de uma replicata experimental dos esferóides referente ao experimento ilustrado nas figuras 75 a 78. Valores da quantificação da fluorescência vermelha divididos pela fluorescência verde em relação ao controle (Valor = 1), dando assim a proporção de células mortas.	107
Figura 79	Esferóides das linhagens Sk-Mel-28, Sk-Mel-28R e Sk-Mel-28RT tratados com 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).	108
Figura 80	Esferóides das linhagens Sk-Mel-19 e Sk-Mel-19R tratados com 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).	109
Figura 81	Esferóides das linhagens Sk-Mel-29 e Sk-Mel-29R tratados com 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).	109
Figura 82	Esferóides da linhagem UACC62 tratados com 1,0 μ M ou 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).	110

Figura 83	Esferóides da linhagem UACC62R tratados com 1,0 μ M ou 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).	111
Figura 84	Quantificação da fluorescência de uma replicata experimental dos esferóides referente ao experimento ilustrado nas figuras 93 a 97. Valores da quantificação da fluorescência vermelha divididos pela fluorescência verde em relação ao controle (Valor = 1), dando assim a proporção de células mortas.	112
Figura 85	Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle) coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 100x (esquerda), 200x (centro) e 400x (direita).	113
Figura 86	Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Imunofluorescência para citoqueratina 10 (verde) e involucrina (vermelho). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior)	113
Figura 87	Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Imunofluorescência para BrdU (verde) e Filagrina (vermelho). Aumento de 100x (superior), 200x (centro) e 400x (inferior).	114
Figura 88	Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Imunofluorescência para Laminina (verde) e Filagrina (vermelho). Aumento de 100x (superior), 200x (centro) e 400x (inferior).	115
Figura 89	Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Imuno-fluorescência para MelanA (marcação de melanoma) em verde (superior), Filagrina em vermelho (centro) e citoqueratina 14 em verde (inferior). Aumento de 200x.	116

Figura 90	Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Controles negativos de imunofluorescência. Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).	116
Figura 91	Peles reconstituídas com células de melanoma da linhagem Sk-Mel-28 coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 100x (esquerda), 200x (centro) e 400x (direita).	117
Figura 92	Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 sem tratamento. Imunofluorescência contra involucrina (vermelho). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).	117
Figura 93	Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 sem tratamento. Imunofluorescência contra o marcador de melanoma MelanA (verde). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).	118
Figura 94	Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 sem tratamento. Imunofluorescência contra laminina (verde) e filagrina (vermelho). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).	119
Figura 95	Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 sem tratamento. Controles negativos de imunofluorescência. Aumento de 200x	119
Figura 96	Peles reconstituídas com células de melanoma da linhagem Sk-Mel-28 coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 100x (esquerda), 200x (centro) e 400x (direita)	120
Figura 97	Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 tratadas por 5 dias com 2ME. Imunofluorescência contra involucrina (vermelho). Aumento de 100x	120

	(superior) e 200x (inferior).	
Figura 98	Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 tratadas por 5 dias com 2ME. Imunofluorescência contra o marcador de melanoma MelanA (verde). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).	121
Figura 99	Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 tratadas por 5 dias com 2ME. Imunofluorescência contra laminina (verde) e filagrina (vermelho). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).	121
Figura 100	Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 tratadas por 5 dias com 2ME. Controles negativos de imunofluorescência. Aumento de 200x.	122
Figura 101	Peles reconstituídas contendo células de melanoma Sk-Mel-28 na ausência de tratamento (coluna à esquerda) ou tratadas com 2ME por 5 dias (coluna à direita). Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) (linha superior), imunofluorescência para o marcador de melanoma MelanA em verde (linha central) e, contra laminina (verde) e filagrina (vermelho) (linha inferior). Núcleos celulares são evidenciados em azul por marcação com DAPI. Notar a diferença de celularidade na derme entre as peles tratadas e não tratadas, evidenciando a menor invasão e proliferação das células tumorais	123
Figura 102	Esquema do efeito do 2ME em células de melanoma humano, mostrando seu efeito na polimerização de tubulina (linhas vermelhas dentro das células), inibição de proliferação (principalmente por indução de senescência), inibição de invasão, e indução de morte celular.	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Listagem das células utilizadas nos experimentos e suas mutações.	13
Tabela 2	Anticorpos primários utilizados nos ensaios de western blotting, os bloqueios e diluições utilizados, bem como os anticorpos secundários.	21
Tabela 3	Anticorpos secundários utilizados nos ensaios de western blotting, e suas diluições.	22
Tabela 4	Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência, e suas diluições utilizados, bem como os anticorpos secundários	25
Tabela 5	Valores de IC50 para as linhagens de melanoma humano indicadas após tratamento com 2ME por 3 dias, 5 dias e 7 dias.	72

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
1. Câncer de pele e Melanoma	1
2. Terapia molecular direcionada e resistência tumoral	3
OBJETIVOS	12
MATERIAL E MÉTODOS	13
1. Cultura de células	13
2. Extração de células para cultura primária	14
3. Testes de Citotoxicidade - MTT (brometo de (3- (4,5- dimetiltiazol – 2il) – 2,5 difeniltetrazólio))	16
4. Testes de Citotoxicidade - Alamar Blue	16
5. Testes de Citotoxicidade - Exclusão por Azul de Tripán	16
6. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	17
7. Análise de apoptose por citometria de fluxo (Anexina V e Iodeto de Propídeo)	17
8. Citometria de fluxo para análise de apoptose e potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	18
9. Contagem do número total de células para avaliação da proliferação celular	18
10. Curvas de Crescimento	19
11. Western Blotting - Obtenção dos extratos protéicos	19
12. Western Blotting - Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE e Transferência para membrana	19
13. Western Blotting - Incubação das membranas com anticorpos	21

primários e secundários

14. Superexpressão do gene LC3 fusionado a GFP em células de melanoma humano através de lentivírus	22
15. Ensaio Clonogênico ou Ensaio de Formação de Colônias	23
16. Esferóides	23
17. Imunofluorescência	24
18. Obtenção de linhagens resistentes e duplo-resistentes	25
19. Coloração para β -galactosidase associada à senescência	27
20. Pele reconstituída contendo melanoma como modelo biomimético de invasão	28
PADRONIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS	29
1. Padronização do tempo de tratamento do ensaio de formação de colônias	29
2. Imunofluorescência para padronização de marcação de células de linhagens de melanoma	30
3. Padronização da pele reconstituída para ensaios tridimensionais	33
CAPÍTULO 1 – RESVERATROL	35
1. Resveratrol e câncer	35
CAPÍTULO 1 – RESVERATROL – RESULTADOS	39
1. Citotoxicidade do RES por Azul de Tripan	39
2. Citotoxicidade por indução de apoptose analisada por citometria de fluxo	45
3. Indução da apoptose verificada por clivagem de caspase	46
4. Ensaio de formação de colônias	48

5. Contagem do número total de células para análise de proliferação	49
CAPÍTULO 2 – 2-METOXIESTRADIOL	52
1. 2-Metoxiestradiol e câncer	52
CAPÍTULO 2 – 2-METOXIESTRADIOL – RESULTADOS	55
1. Citotoxicidade do 2ME por MTT	55
2. Citotoxicidade do 2ME por Azul de Tripan	57
3. Ensaio de formação de colônias	62
4. Contagem do número total de células	65
5. Curvas de Crescimento	68
6. Ensaio de Alamar Blue e IC50	69
7. Análise da externalização de fosfatidilserina e permeabilidade da membrana celular (Anexina V e Iodeto de Propídeo) por citometria de fluxo	73
8. Externalização de fosfatidilserina e potencial de membrana mitocondrial (Anexina V e TMRM) por citometria de fluxo	74
9. Indução da via de sinalização da apoptose	76
10. Análise da indução de vacúolos autofágicos	79
11. Indução de vesículas ácidas	80
12. Proteínas associadas à regulação do processo autofágico	82
13. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	84
14. Análise de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular	88
15. Outras proteínas relacionadas à proliferação	90
16. Ensaios para detecção de Senescência	92
17. Efeitos na polimerização da Tubulina	96

18. Efeito do 2-metoxiestradiol em Modelo de esferóides	103
19. Efeito do 2-metoxiestradiol em Modelo de Pele Reconstituída	113
DISCUSSÃO	124
CPNCLUSÃO	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
ANEXO	144

INTRODUÇÃO

1. Câncer de pele e Melanoma

O câncer é a principal causa de morte em países desenvolvidos, e a segunda causa de morte em países em desenvolvimento (Jemal et al. 2011), perfazendo 8,2 milhões das causas de todas as mortes globalmente (Globocan 2014). Nos Estados Unidos são estimados 1.665.540 novos casos de câncer para 2014, sendo que cerca de 1/3 deste número (585.720) é o estimado para mortes por esta malignidade (Siegel et al. 2014).

O câncer de pele é o tipo de câncer mais comum na população de pele clara em todo o mundo (Greinert 2009, Narayanan et al. 2010). Os principais tipos de cânceres de pele são o Carcinoma Basocelular (BSC – Basal Cell Carcinoma), Carcinoma Espinocelular (SCC – Squamous Cell Carcinoma) e Melanoma Maligno (MM – Malignant Melanoma) (Greinert 2009). Só nos Estados Unidos são estimados mais de 76000 casos de melanoma de pele, e mais de 9700 mortes por este tipo de câncer (Siegel et al. 2014). No Brasil, este câncer (melanoma e não melanoma) é o mais freqüente, sendo responsável por cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados (INCA 2014)

O Carcinoma Basocelular é o tipo mais frequente, e não apresenta lesões precursoras conhecidas. Apesar da alta incidência, este tipo tumoral raramente gera metástases, não levando a muitos óbitos. A grande maioria destes tumores se apresenta na região da cabeça e pescoço (86%), e ele pode invadir regiões de tecidos de menor resistência, levar a lesões de gravidade estética e se espalhar por tecidos como cartilagem e periósteo (Netscher et al. 2011). A sua etiologia está intimamente relacionada com a desregulação da via de sinalização de Hedgehog. Análises de *microarray* mostram que além das vias de sinalização de Hedgehog e Wnt, as de apoptose, MAPK (mitogen activated protein kinase) e de ciclo celular também estão alteradas nas células destes tumores (Greinert 2009).

O Carcinoma Espinocelular, ao contrário do Basocelular, está mais ligado à lesões pré-malignas. Pode ocorrer em membranas mucosas, na genitália e metastatiza para linfonodos e de forma hematogênica. O

prognóstico deste tipo de tumor depende de algumas características como grau de diferenciação, localização, tamanho e profundidade do tumor, taxa de crescimento, recorrência e invasão perineural (Netscher et al. 2011). Para este tipo tumoral, a etiologia está intimamente ligada à via de sinalização regulada por p53. A análise de níveis de cDNA indica que lesões pré-malignas mostram alterações em genes envolvidos na desregulação da produção de matriz extracelular e no processo apoptótico. Estágios mais avançados mostram alterações em genes envolvidos no reparo do DNA e na via da sinalização de MAPK (Greinert 2009).

O melanoma, dentre os tipos de câncer de pele, é o de menor frequência, sendo responsável por apenas 3%-4% dos casos, porém é letal em cerca de 75%-80%. O prognóstico de morte para esse tipo de tumor é de 6 a 9 meses, e a taxa de sobrevivência por 5 anos é menor que 5% (Gray-Schopfer et al. 2007, Greinert 2009, Nikolaou et al. 2012).

A baixa eficiência de químico-, imuno- e radioterapias no tratamento de melanoma é uma das características deste tumor devido à sua resistência, o que torna a busca por novos fármacos e compostos, bem como a busca de novas estratégias eficientes para seu combate muito necessária e desafiadora (Gray-Schopfer et al. 2007, Greinert 2009, Ibrahim and Haluska 2009, Nikolaou et al. 2012). Particularmente, a ineficiência de compostos quimioterápicos e outros estímulos externos de induzirem morte celular por apoptose nestes tumores após o tratamento é uma vantagem seletiva para a progressão e metástase do melanoma, levando à aquisição de resistência às terapias atualmente vigentes. (Hersey and Zhang 2001, Soengas and Lowe 2003, La Porta 2007, Ibrahim and Haluska 2009, Nikolaou et al. 2012).

2. Terapia molecular direcionada e resistência tumoral

Os melanócitos são células pigmentadas, que produzem melanina, encontradas nos olhos e na pele, bem como em seus anexos. Na pele, eles se encontram na camada basal da epiderme. Os melanomas surgem da transformação maligna desse tipo celular (Gray-Schopfer et al. 2007, Smalley 2010, Aplin et al. 2011, Flach et al. 2011). Os melanócitos são as células que protegem a pele da radiação UV, e a incidência desta radiação sobre eles leva à produção de melanina para a sua proteção, bem como de células vizinhas, os queratinócitos. Após a incidência de radiação ionizante, a maioria dos outros tipos celulares é levada à morte ou à parada no ciclo celular como resposta para o reparo do DNA que possa estar danificado em função da radiação. Os melanócitos e seus precursores são “programados para sobreviver” a esses efeitos, pois em vez de parada de ciclo e reparo de DNA estas células são estimuladas a produzir melanina para si mesmas e suas células vizinhas. Além disso, por estímulos parácrinos estas células têm seus níveis de Bcl-2, um fator anti-apoptótico, e do fator de transcrição MitF aumentados em situações de estresse por radiação ionizante, e estes são alguns motivos pelos quais os melanomas são tão resistentes ao efeito de diversas drogas (Soengas and Lowe 2003). Além disso, as bombas de efluxo e as enzimas de detoxificação, o aumento do nível de proteínas anti-apoptóticas e a diminuição dos níveis de proteínas pró-apoptóticas, são características do melanoma adquiridas de forma primária, e não durante ou após o tratamento (Soengas and Lowe 2003). Isso contribui para a quimio-resistência inicial deste tipo de tumor, que corrobora a hipótese de que estas células, como colocado por Soengas e Lowe (2003) “nasceram para sobreviver”.

Assim, os melanomas são refratários a diversos tipos de terapia, e muitos testes clínicos com estratégias de imunoterapia, radioterapia e quimioterapia falham em aumentar a sobrevida de pacientes que sofrem dessa malignidade (Soengas and Lowe 2003, Ibrahim and Haluska 2009, Aplin et al. 2011, Nikolaou et al. 2012). A quimiorresistência a fármacos é um problema crítico 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 dos melanócitos (Childs and Ling 1994, Deichmann et al. 2005).

A Decarbazina, um agente metilante, ainda é a quimioterapia aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) mais eficaz para melanomas metastáticos, mas a sua resposta clínica é de apenas 10-20% ((Lui et al. 2007, Ibrahim and Haluska 2009, Nikolaou et al. 2012). Imunoterapia com altas doses de IL-2 (interleucina-2) ou IFN- α (interferon- α) tem respostas clínicas menores ou até comparáveis com a da Decarbazina, mas os efeitos adversos são mais intensos (Ibrahim and Haluska 2009, Ji et al. 2010, Nikolaou et al. 2012). A radioterapia não é eficaz contra melanoma, pois este é extremamente refratário ao tratamento com radiação, que só é empregada como tratamento paliativo em paciente com múltiplas metástases (Ibrahim and Haluska 2009).

Uma forma de tratamento é imunoterapia, e avanços no tratamento de melanoma foram realizados neste campo. Com a vacina com o anticorpo monoclonal específico para CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) contendo peptídeo gp100 (IPILIMUMAB), que aumenta a sobrevida dos pacientes que receberam o tratamento para cerca de 10 meses (Hodi et al. 2010, Sondak et al. 2011, Atefi et al. 2014, Mamalis et al. 2014, Sznol 2014), esta vacina melhora as respostas imunológicas, incluindo as anti-tumorais, tornando mais eficaz o efeito de outras drogas quando utilizadas em sinergia (Nikolaou et al. 2012).

Mais recentemente, outro alvo tem sido o foco de imunoterapias. O receptor PD-1 é induzido na superfície de células T do sistema imune quando estas são ativadas, e seu ligante PD-L1 é expresso de forma constitutiva em diferentes tumores, incluindo melanoma (Atefi et al. 2014). Quando expressos nessas células, ocorre um sinal de inibição das células do sistema imune, as deixando anérgicas (Atefi et al. 2014, Mamalis et al. 2014). Anticorpos contra estas proteínas, como nivolumab (Bristol-Meyers) e pembrolizumab (Merk) impedem esta interação, revertem esta inibição e levam à reativação do sistema imune (Atefi et al. 2014). Este tipo de tratamento já se mostrou eficaz, com taxas de resposta de 38% e respostas clínicas objetivas duráveis (Hamid

et al. 2013, Mullard 2013, Atefi et al. 2014, Mamalis et al. 2014, Sznol 2014). Hoje, se propõe o tratamento com a combinação de diferentes anticorpos, bem como o estudo de outros agentes que bloqueiem a ação de outros mecanismos inibidores de células T (Sznol 2014). Um exemplo da eficácia dessas combinações é mostrado em um trabalho recente que combina nivolumab com ipilimumab, e mostra que esta combinação leva a respostas mais eficazes que ambas as monoterapias (Wolchok et al. 2013, Mamalis et al. 2014).

Outras descobertas recentes dadas pela análise do perfil molecular, hibridização comparativa de genomas e análise de mutações por seqüenciamento de genes mostram diferentes mutações e alterações em vias de sinalização responsáveis pelo desenvolvimento, progressão e sobrevivência do melanoma (Gray-Schopfer et al. 2007, Russo et al. 2009, Smalley 2010). Esses dados sugerem que o melanoma tem uma etiologia muito complexa e que representa um grupo de tumores muito heterogêneo, com padrões de mutações oncogênicas, superexpressão de genes e amplificações distintos (Brose et al. 2002, Ibrahim and Haluska 2009, Smalley 2010, Nikolaou et al. 2012). Um resumo de algumas das mutações presentes em vias de sinalização importantes em melanoma está apresentado na Figura 1. A descoberta destas mutações possibilitou estratégias de tratamento direcionadas para alvos moleculares específicos de cada tipo de melanoma com determinadas vias de transdução alteradas (como a via de RAS-RAF-MAPK), e a combinação de drogas direcionadas para estes alvos levaria a uma maior eficiência e benefícios terapêuticos (Russo et al. 2009, Smalley et al. 2009, Ji et al. 2010, Nikolaou et al. 2012, Das Thakur et al. 2013).

Com a descoberta de mutações que tornam as proteínas NRAS e BRAF ativas e subsequente ativação constitutiva da via de sinalização de sobrevivência das MAPKs (mitogen-activated protein kinase), começou uma nova fase na busca de compostos para o tratamento de melanomas (Fecher et al. 2009, Smalley 2010). As proteínas RAS sofrem modificações pós traducionais, como a farnesilação, gerolinação e isoprenilação, para sua localização na membrana e posterior ativação. FTIs (farnesyltransferase inhibitors) foram utilizados para inibir sua ativação, e apesar de citotoxicidade *in vitro* testes clínicos de fase II foram interrompidos pelas respostas negativas dos pacientes (Fecher et al. 2009). BRAF é um sinalizador da via de MAPKs a

jusante à proteína RAS. Apesar de NRAS estar mutado em 15% a 20% dos melanomas (Brose et al. 2002) sabe-se hoje que cerca de 60% dos melanomas têm mutações em BRAF (Davies et al. 2002). Destas mutações presentes no gene de BRAF 80% delas resultam numa substituição V600E (Smalley 2010, Wan et al. 2004).

Um desses alvos específicos, que ocorre em cerca de 60% dos melanomas metastáticos, é a proteína BRAF, que é mutada no sítio V600E levando a uma proteína com atividade constitutiva (Brose et al. 2002, Davies et al. 2002, Gray-Schopfer et al. 2007, Smalley et al. 2009, Ibrahim and Haluska 2009, Puzanov and Flaherty 2010, Nikolaou et al. 2012). Tendo a terapia direcionada específica como objetivo, um novo fármaco desenvolvido para o tratamento de melanomas é o inibidor específico de BRAF (Vemurafenibe), que tem especificidade maior pelo BRAF com a mutação V600E que para o BRAF selvagem, e compostos como este revolucionaram o tratamento de melanoma (Smalley 2010, Aplin et al. 2011, Nikolaou et al. 2012, Das Thakur et al. 2013, Mamalis et al. 2014). Este composto mostrou, em testes clínicos de fase I, que 81% dos pacientes com tumores que apresentavam esta mutação mostraram resposta objetiva de regressão do tumor por critério RECIST, após o tratamento com Vemurafenibe (Flaherty et al. 2010). Por outro lado, a melhoria no período de sobrevida sem tumor não foi muito efetivo, sendo em média de 7 meses (Smalley and Sondak 2010, Aplin et al. 2011, Mamalis et al. 2014), mostrando que os tumores tornam-se, a longo prazo, resistentes ao tratamento com este composto.

A resistência ao Vemurafenibe adquirida pelas células tumorais pode ser devida a diversos fatores, como a reativação da sinalização da via RAF-MEK por aumento compensatório da expressão de outras moléculas, por alterações na via reguladora de ciclo celular por ERK1/2, por ativação de vias de sinalização alternativas, ou por alterações epigenéticas (Nikolaou et al. 2012, Yap et al. 2013). Um trabalho recente mostra que o tratamento de células BRAF mutantes com Vemurafenibe pode ser mais eficiente dependendo da administração deste composto. Verificou-se que as células tratadas continuamente com esta droga podem se tornar dependentes da reativação da via de sinalização RAF-MEK-ERK, e que a descontinuidade do tratamento leva a uma remissão tumoral (Das Thakur et al. 2013). Sendo assim, a

administração intermitente do Vemurafenibe mostrou-se mais eficiente que o tratamento contínuo.

A aquisição da resistência aos inibidores de BRAF em tumores BRAF mutantes levou a extensa pesquisa dos mecanismos pelos quais os tumores se tornavam irresponsivos a este tratamento. Diversos trabalhos discutem que diferentes vias compensatórias são ativadas em tumores que voltam a crescer em pacientes tratados com Vemurafenibe ou Darbafenibe (Yap et al. 2013, Luke and Hodi 2013, Larkin et al. 2014, Ma et al. 2014, Long et al. 2014, Kwong and Davies 2014, Grazia et al. 2014).

Dentre estes mecanismos está a reativação da via das MAPK por mutações ativadoras de NRAS, amplificação de BRAF V600E ou ativação independente por receptores tirosina kinase (Flaherty et al. 2012, Luke and Hodi 2013, Long et al. 2014, Grazia et al. 2014, Kwong and Davies 2014). Desta forma, foram propostos estudos com combinações de inibidores de BRAF com inibidores específicos de MEK. Em estudos clínicos, estas combinações se mostraram eficientes, levando a aumento na sobrevida livre de tumor, e na resposta global em pacientes com melanomas BRAF mutantes (Flaherty et al. 2012, Long et al. 2014, Larkin et al. 2014).

Outros mecanismos de resistência aos inibidores de BRAF V600E compreendem ativação da via de PI3K/AKT (Mena 2013, Luke and Hodi 2013, Grazia et al. 2014). Combinações de inibidores de BRAF com agentes que inibem esta via foram propostas e estão sendo testadas (Mena 2013, Lassen et al. 2014, Kwong and Davies 2014, Grazia et al. 2014). De fato, um estudo combinando o inibidor de BRAF dabrafenibe com o inibidor de AKT GSK2141795B mostrou que os dois compostos em conjunto têm efeito sinérgico na inibição do crescimento tumoral e na indução de morte celular. Além disso, a adição deste composto no tratamento de células tumorais de melanoma leva a um retardamento na aquisição de resistência pelas mesmas (Lassen et al. 2014).

Além da via das MAPKs outras vias são frequentemente ativadas em melanomas, é o caso da via de PI3K/AKT, que já foi citada acima como via de resistência, e está relacionada com sinalização para crescimento celular, proliferação, motilidade e sobrevivência (Fecher et al. 2009, Smalley 2010). PTEN é uma proteína que, quando ativada, previne a ativação de AKT, e a

expressão de PTEN é perdida em cerca de 30% das linhagens de melanoma (Lin et al. 2008), e há perda alélica de sua expressão em 58% das metástases de melanoma (Brick et al, 2000). Somado a isso, cerca de 43% - 50% dos melanomas possuem atividade constitutiva de AKT3 (Stahl et al. 2004). A inibição dessa via utilizando inibidores de PI3K, ou estratégia de RNAi inativando AKT3, reduz o crescimento de melanoma e induz a apoptose (Stahl et al. 2004). Ensaios pré-clínicos de um inibidor de PI3K (PX-866) mostraram significativa diminuição do crescimento e invasão em cultura 3D de esferóides *in vitro* (Howes et al. 2007).

Outro alvo para novos compostos a serem testados é a via da morte celular programada do tipo I, ou apoptose. As células tumorais acumulam uma série de alterações genotípicas que favorecem a evasão de morte celular por aumento da expressão de membros da família antiapoptótica Bcl-2, como Bcl-2, Bcl-x_L e Mcl-1 (Soengas and Lowe 2003, Verhaegen et al. 2006, Fecher et al. 2009, Smalley 2010). Além disso, fatores pró-apoptóticos como Apaf-1, BIM e BAD têm sua atividade diminuída (Datta et al. 1997, Soengas and Lowe 2003, Cartlidge et al. 2008, Smalley 2010). Tudo isso favorece um ambiente intracelular que protege a célula tumoral da morte celular programada. Inibidores desses fatores anti-apoptóticos, como o composto ABT-737 não mostraram resultados pré-clínicos significantes quando usados em monoterapia, mas quando combinados com compostos citotóxicos como inibidores de MEK foram capazes de induzir morte celular em melanoma (Fecher et al. 2009). Outro composto que está sendo usado atualmente em testes clínicos de fase III e mostrou efeitos positivos em testes de fase II é o Tasisulam (Eli Lilly and Company, Indianapolis) que mostra efeito anti-proliferativo e citotóxico com a indução da via mitocondrial de apoptose (Kirkwood et al. 2011, Garbe et al. 2011).

Outro processo que vem sendo rediscutido no tratamento de câncer é o processo de autofagia, que pode ser considerado uma forma de “autodigestão” celular. Esse nome refere-se às vias de degradação de componentes do citoplasma como proteínas e organelas que são levadas ao lisossomo para sua degradação. Existem pelo menos três formas de autofagia: mediada por chaperona, microautofagia e macroautofagia (Rubinsztein et al. 2007, Levine and Kroemer 2008). Esses processos se diferenciam em relação à forma pela

qual os componentes citoplasmáticos são levados ao lisossomo (Levine and Kroemer 2008). O processo de macroautofagia é o mais estudado em câncer por conferir resistência às células tumorais.

A resistência ao estresse conferida pela autofagia tem uma função adaptativa nas células, porém, no contexto do câncer, pode ser considerado potencialmente um mal adaptativo (Mizushima et al. 2008). Em tumores é muito comum o estresse metabólico, e a maioria dos agentes quimioterápicos, bem como a radioterapia, induzem estresse celular. Dessa forma, intensas investigações são realizadas no sentido de estudar se a sobrevivência devida à autofagia deve ser bloqueada em tumores para promover a morte celular destas células (Mizushima et al. 2008). Recentes estudos mostram que inibição genética ou farmacológica da autofagia aumenta a citotoxicidade de agentes quimioterápicos no câncer (Kondo et al. 2005, Mizushima et al. 2008, Li et al. 2009). No melanoma as vesículas autofágicas estão intimamente relacionadas aos melanossomos (Lazova et al. 2010). Como revisado por Fecher e colaboradores (2010) os melanomas, em especial, contam com esse processo para sobreviver ao estresse metabólico e terapêutico (Fecher et al. 2009). Em estudo de Jie Li e colaboradores (2009) foi demonstrado que a inibição da autofagia pelo composto 3-metiladenina (3-MA) aumenta o efeito da droga 5-fluorouracil (5-FU) na indução de apoptose em células de câncer de colo retal (Li et al. 2009). Da mesma forma, Paglin e colaboradores (2001) verificaram que a inibição de autofagia pelo agente bafilomicina A1 em células de câncer de colo retal, mama e próstata tratadas com radiação γ , e levou a um aumento do efeito antitumoral e, por fim, as células morriam por apoptose (Paglin et al. 2001, Kondo et al. 2005). Trabalhos mais recentes também mostraram que, em melanoma, a indução do processo autofágico pode ser utilizada como alvo para o desenvolvimento de tratamentos anti-melanoma mais eficientes. Um estudo em linhagens de melanoma BRAF selvagem mostrou que a combinação de quimioterápicos com um inibidor de AKT (MK2206) foi eficiente no tratamento de melanoma, mas a adição de Cloroquina para inibir o processo autofágico potencializou o efeito desta combinação na morte celular (Rebecca et al. 2014). Em outro estudo linhagens e tumores de melanoma BRAF mutantes foram tratados com inibidores de BRAF ou com a combinação de inibidores de BRAF e MEK, e se observou a indução do processo autofágico de

forma citoprotetora. A inibição da autofagia com hidrocloroquina inibiu o crescimento tumoral e potencializou a indução de morte celular causada por estes tratamentos (Ma et al. 2014).

Outra abordagem terapêutica, como o bloqueio do sistema ubiquitina-proteassoma tem sido também usada como via alternativa que pode ser alvo para o desenvolvimento de novos inibidores farmacológicos com potencial anti-tumoral (Jesenberger and Jentsch 2002, Fernández et al. 2006, Tormo et al. 2009, Roberti et al. 2011, Brohem et al. 2012, Rebecca et al. 2014).

Em uma revisão recente, Yap e colaboradores (2013) discutem que a combinação de dois compostos que têm diferentes alvos na mesma via de sinalização (por exemplo V600E-BRAF e MAPK), alvos em vias de sinalização paralelas (por exemplo V600E BRAF e AKT), ou mesmo alvos de vias de sinalização diferentes que conferem mecanismos adaptativos de resistência ao tumor (por exemplo AKT e Receptor de Fator de Crescimento Insulin-Like (IGF-1R)) são estratégias válidas para a contenção do desenvolvimento e crescimento tumoral. O autor também argumenta que novas investigações que elucidam aspectos pré-clínicos destas combinações são extremamente necessárias para elaborar testes clínicos mais eficientes (Yap et al. 2013).

Sendo assim, a resistência intrínseca ou adquirida nos melanomas é um fator limitante importante para a contenção da doença em longo prazo, indicando que ainda há muito a ser estudado e explorado no que diz respeito aos mecanismos de desenvolvimento e progressão da doença. Isto torna imprescindível o uso de terapias combinatórias e a busca de novas moléculas anti-tumorais, bem como a elucidação dos mecanismos pelos quais a resistência se desenvolve se torna cada vez mais importante (Smalley 2010, Smalley and Sondak 2010, Nikolaou et al. 2012, Sznol 2014).

Figura 1: Resumo de vias de sinalização importantes no melanoma e em sua progressão, mostrando as proteínas mais frequentemente mutadas (marcação com estrelas). Figura modificada de (Smalley 2010) com dados de (Nikolaou et al. 2012).

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito dos compostos 2-metoxiestradiol (2-ME) e Resveratrol na contenção tumoral de linhagens de melanoma metastático nos modelos de monocamada e pele artificial. Como ressaltado anteriormente, diversas vias são alteradas em melanoma, e verificar o modo de ação dos compostos e a sua possível modulação de algumas vias de sinalização faz parte dos objetivos do projeto, sendo de suma importância para uma possível utilização futura como composto adjuvante em pesquisas subseqüentes.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultura de células

As células de melanoma humano (linhagens SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103, SK-Mel-147, SK-Mel-173, os queratinócitos (FK289) e melanócitos (FM305 e FM307) foram doadas pela Profa. Dra. María Soengas do Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) Madri, Espanha. É importante ressaltar que as diferentes linhagens utilizadas possuem diferentes mutações em diferentes genes (Tabela 1). Algumas destas mutações são comuns em diversos casos de melanoma. Empregar diferentes linhagens é importante para mostrar o efeito dos compostos aqui estudados de forma independente das mutações presentes nas células.

Tabela 1: Listagem das células utilizadas nos experimentos e suas mutações.

Gene	Sk-Mel 19	Sk-Mel- 28	Sk-Mel- 103	Sk-Mel- 147	Sk-Mel- 173	UACC62
P53	wt	R273H	wt	wt	wt	wt
BRAF	V600E	V600E	wt	wt	wt	V600E
N-Ras	wt	wt	Q61R	Q61R	wt	wt
PTEN	+	+	-	-	-/+	-

As células foram cultivadas à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os fibroblastos e melanomas foram mantidos em meio DMEM (Sigma, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina). Os queratinócitos foram mantidos em meio Epilife (SKU# M-EPICF-500, Cascade Biologics) suplementado com Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS - SKU# S-001, Cascade Biologics). Já os melanócitos foram mantidos com o meio 254CF (SKU# M-254CF-500, Cascade Biologics), suplementado com Human Melanocyte Growth Supplement (HMGS - SKU# S-002-5, Cascade Biologics).

Além disso, fibroblastos, melanócitos e queratinócitos humanos oriundos de cultura primária de pele de prepúcio foram também mantidos como descrito acima.

2. Extração de células para cultura primária

Para obtenção de cultura primária das células da pele (queratinócitos, melanócitos e fibroblastos) foram doados tecidos de pele de prepúcio pela Dra Linda Maximiano, cirurgiã do Hospital Universitário (HU). Para tanto o projeto passou por apreciação e aprovação do Comitê de Ética do HU (Processo no. CEP HU 943/09 - ANEXO).

No dia do recebimento da pele de prepúcio é realizada uma lavagem onde o tecido é passado em etanol 90% e em solução fosfato salina (PBS) estéril. Para tanto, invertemos o tubo onde se encontra o tecido. Logo após, o tecido é colocado em uma placa de Petri com 1 mL da Solução A (22,5mM HEPES, 7,6mM Glicose, 2,25 mM KCl, 100mM NaCl, 0,75 mM Na_2HPO_4 ; pH7,4). Deste fragmento é retirado o tecido adiposo e vasos sanguíneos presentes e, então a pele de prepúcio é cortada em fragmentos de 3x3mm, e são adicionados 5mL da Solução A contendo tripsina ou dispase. Após 16-18h de incubação à temperatura ambiente, a derme e epiderme são separadas com auxílio de pinças.

A epiderme é colocada em um tubo contendo meio específico para queratinócitos (Clonetics - KBM-Gold – Lonza) e então é centrifugada por 3 minutos a 2000 rpm e replaqueada em placa de petri contendo meio de queratinócitos. Após 24h o meio é substituído. Acompanha-se o crescimento das células provenientes da epiderme ao longo dos dias. Quando a confluência é atingida, inicia-se o processo de separação das células por meio de tripsinização, uma vez que os melanócitos possuem uma aderência à placa e às células muito menor que os queratinócitos. Após 1 ou 2 passagens, as culturas estão “puras”, ou seja, não contaminadas com outras células (Figura 2). No caso dos melanócitos, são cultivados em meio específico (Cascade Biologics Medium 254 – Life Technologies) e é adicionado o antibiótico Gentamicina por 48h para a seleção completa, uma vez que essas células são resistentes a ação da gentamicina.

Figura 2: Culturas de A) FP#30 – Fibroblastos B) MP#30 – Melanócitos C) KP#30 – Queratinócitos após separadas. Aumento de 100x. D) FP#30 – Fibroblastos E) MP#30 – Melanócitos F) KP#30 – Queratinócitos após separadas. Aumento de 400x

A derme é colocada em solução de collagenase tipo I por 4 a 12 horas em agitação. Após esse período adiciona-se 1mL de Soro Fetal Bovino (SFB), inativando a enzima, e a derme é centrifugada (3 minutos a 2000 rpm). O tecido é, então, ressuspensão e colocado em placa de petri contendo 10mL de meio DMEM suplementado com 10% SFB e antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina). Após 24h o meio é substituído. Acompanha-se a cultura dos fibroblastos, até a obtenção de uma placa com aproximadamente 90% de confluência (3-4 dias) (Figura 2).

3. Testes de Citotoxicidade - MTT (brometo de (3- (4,5- dimetiltiazol – 2il) – 2,5 difeniltetrazólio))

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, que é baseado na redução do sal pelo sistema enzimático mitocondrial, através das atividades de desidrogenases que clivam o anel tetrazólico e convertem o MTT em um produto insolúvel denominado formazan, o qual reflete o normal funcionamento da mitocôndria e conseqüentemente a viabilidade celular. As células foram plaqueadas (10^4 células por poço) em placas de 96 poços por 24 horas, e em seguida incubadas com diferentes concentrações dos compostos durante 20 horas. Após essa etapa foi adicionado MTT durante as 4 últimas horas de incubação na concentração final de 5mg/ml, permitindo a formação do formazan (precipitado). Toda a solução foi retirada da placa, e os cristais de formazan foram então dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância de cada poço foi lida por um leitor de microplaca em 570nm.

4. Testes de Citotoxicidade - Alamar Blue

As células de melanoma foram plaqueadas ($2,5 \times 10^3$ por poço) em placas de 96 poços em 100µL de meio DMEM contendo 10%SBF. Após incubação para adesão das células elas foram tratadas com veículo, 50% de DMSO e concentrações crescentes de 2ME (0,01µM a 30µM). Após 24h, 48h e 72h a atividade metabólica das células foi verificada utilizando-se o reagente Alamar Blue (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Os dados utilizados para a plotagem dos gráficos foram os de absorbância a 530nm. As curvas ajustadas e cálculo de IC50 foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

5. Testes de Citotoxicidade - Exclusão por Azul de Tripán

A viabilidade celular também foi avaliada pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripan (0,4% em tampão fosfato, PBS) no qual as células são consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentavam no seu interior a coloração azul. Sendo assim, as células foram

plaqueadas (5×10^4 por poço) em placas de 24 poços e após 24h o meio foi trocado por outro com as várias concentrações dos compostos. As células foram incubadas com essa solução por diferentes tempos de tratamento. Após essa etapa as células foram coletadas através de tripsinização e à suspensão delas foi adicionado o corante azul de tripan (0,4%). Após a adição do corante as células, coradas e não coradas foram contadas em câmaras de Neubauer.

6. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A linhagem celular SK-Mel-103 foi plaqueada em placas de 6 poços (5×10^5 células por poço). Após 24 horas foram tratadas com 2-ME nas concentrações de 0,5 μ M; 1 μ M e 10 μ M. Após 24h e 48h de tratamento as células foram coletadas.

Após a coleta das células aderidas e presentes no sobrenadante, as mesmas foram passadas para um tubo falcon e centrifugadas a 1000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi lavado e ressuspensionado com PBS gelado. Após nova centrifugação a 1000 rpm por 3 minutos as células contidas no sedimento foram resuspendidas em tampão de lise (PBS contendo 10mg/mL de RNase, 0,1% de triton x-100 e 50 μ g/mL de Iodeto de Propídio)

Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente a fluorescência foi medida em um citômetro de fluxo (FACSCanto Beckton Dickinson, CA, USA) em canal FL2 - 620nm. 10.000 eventos foram analisados por experimento.

7. Análise de apoptose por citometria de fluxo (Anexina V e Iodeto de Propídeo)

A apoptose foi realizada pela análise da externalização da fosfatidilserina (FS), que foi analisada por citometria de fluxo como descrito por Brohem et al com pequenas modificações (Brohem et al. 2012). A análise por citometria de fluxo foi feita após a marcação com o conjugado fluoresceína (FITC) - Anexina V (Anexina V - FITC) ou (APC) – Anexina V. As células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e então ressuspensionadas em 100 μ L de

tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM, NaCl 2.5 mM CaCl_2) na concentração de 1×10^6 células por mL. Anexina V - FITC ou Anexina V – APC (1mg/mL) foram adicionadas às células e essas foram então incubadas por 20 min à temperatura ambiente no escuro. Logo após, adicionou-se 10 μL de solução de IP (100 $\mu\text{g/mL}$) e 400 μL de tampão de ligação, e as células foram analisadas por citometria de fluxo. Anexina V é uma proteína ligada a fosfolípidos que tem alta afinidade a FS. IP foi utilizado para distinguir células viáveis de não viáveis. A fluorescência da anexina V-APC foi medida na fluorescência vermelha (660nm) e IP na fluorescência vermelho-laranja (585/42 nm).

8. Citometria de fluxo para análise de apoptose e potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Depois do tratamento das células com 2ME por 5 dias, elas foram lavadas com tampão de ligação de Anexina [10 mmol/L HEPES (pH 7.4), 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl_2], ressuspensas em 100 μL de tampão de ligação contendo 1 μL Anexina V APC-conjugada (R&D Systems, Minneapolis, MN) e 25 nmol/L de tetrametilrhodamina metil ester perclorato (TMRM; Molecular Probes, Eugene, OR), e incubadas a 37°C por 15 min. As células foram então analisadas para Anexina V (verde) e retenção de TMRM (vermelho) em citometria de fluxo.

9. Contagem do número total de células para avaliação da proliferação celular

Após o tratamento das diferentes células primárias e linhagens de melanoma com 2-ME nas concentrações de 0,5 μM ; 1 μM e 10 μM e com RES nas concentrações de 10 μM , 50 μM e 100 μM as células aderidas e presentes no sobrenadante foram contadas após 24h, 48h e 72h de tratamento, somando assim o total de células viáveis e não viáveis. A plotagem do número total de células foi feita sempre em comparação com o controle (não tratado), sendo este expresso como 100%.

10. Curvas de Crescimento

As linhagens celulares de melanoma humano foram plaqueadas (1×10^4 células por poço) em placas de 24 poços. Após a adesão das células estas foram tratadas com 0,5 μ M ou 1 μ M de 2ME ou cultivadas na ausência deste composto. As células foram tripsinizadas após 1 dia, 3 dias, 5 dias e 7 dias de tratamento, e então submetidas a centrifugação. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em PBS e contadas em câmara de Neubauer. Os resultados foram plotados e as curvas ajustadas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0. Da mesma forma, este software foi utilizado para calcular o tempo de dobramento das células.

11. Western Blotting - Obtenção dos extratos protéicos

Foram utilizados extratos protéicos totais. As células foram plaqueadas (10^6 por placa) em placas de petri de 100 mm e submetidas a tratamento com diferentes concentrações de 2-ME, RES e os compostos para controles experimentais (para apoptose foi realizado tratamento com Doxorrubicina a 1,5mg/mL). As células foram lisadas com tampão RIPA+ (NaCl 150mM; Tris HCl (pH 7,5) 50 mM; NP-40 5%; EDTA 0,1mM) na presença de inibidores de proteases (Protease inhibitor cocktail tables – Roche, Mannheim, Germany). Incubadas a 4°C por 20 min e então transferidas para microtubo (1,5 mL). Após centrifugação por 20 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram mantidos a – 80°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford.

12. Western Blotting - Separação das proteínas no gel de SDS-PAGE e Transferência para membrana

Para separação das proteínas foi feito gel de SDS-PAGE com 10% de acrilamida. Em cada canaleta foram colocados 30-50 μ g de extrato protéico total em 20 μ l de tampão de lise, adicionados de 5 μ l de tampão de amostra 5X (Tris-HCl 62,5mM pH6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,1%, DTT 50mM) aquecido à 90°C por 10' (condições desnaturantes) e 8 μ l de

marcador de peso molecular Rainbow (RPN800V, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) em cada gel. A corrida foi feita à 70V / 30min durante o gel de empilhamento e a 100V / 1:30h durante o gel de separação.

Em seguida foi realizada a transferência úmida das amostras de proteína para uma membrana de polivinilidene difluoreto (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) utilizando o Tampão de Transferência (Tris Base 25mM, Glicina 192mM pH8.3, com 20% de Metanol) à 4°C / 200mA / 1:30h.

13. Western Blotting - Incubação das membranas com anticorpos primários e secundários

Tabela 2: Anticorpos primários utilizados nos ensaios de western blotting, os bloqueios e diluições utilizados, bem como os anticorpos secundários.

Anticorpo	Marca N. Cat.	Bloqueio	Secundário	Diluição
ATG5	Cell Signaling #12944	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
Bcl-2	Cell Signaling #2872	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
Beclin-1	Cell Signaling #3495	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
Beta-actina	Sigma-Aldrich A5441	5% Leite em TBST	Camundongo	1:5000
Caspase 3	Cell Signaling #9662	5% Leite em TBST	Coelho	1:1000
Caspase 7	Cell Signaling #9492	5% Leite em TBST	Coelho	1:1000
Caspase 9	Cell Signaling #9502	5% Leite em TBST	Coelho	1:1000
Cdc25A	Cell Signaling #3652	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
Ciclina B1	Cell Signaling #4135	5% Leite em TBST	Camundongo	1:1000
ERK total	Cell Signaling #9102	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
ERK fosforilado	Cell Signaling #9101	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
GAPDH	Sigma-Aldrich G8795	5% BSA em TBST	Camundongo	1:5000
Histona H3 H3K9me3	Active Motif #39161	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
LC3A	Cell Signaling #4599	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
LC3B	Cell Signaling #3868	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
p21-Cip1	BD Laboratory 610233	5% BSA em TBST	Camundongo	1:1000
p27-Kip1	BD Laboratory 6110241	5% BSA em TBST	Camundongo	1:500
p62	Cell Signaling #8025	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
Parp Clivado	Cell Signaling #9541	5% Leite em TBST	Camundongo	1:1000
Rb total	Cell Signaling #9309	5% Leite em TBST	Camundongo	1:1000
Rb fosforilado	Cell Signaling #9308	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000
Wee1	Cell Signaling #4936	5% BSA em TBST	Coelho	1:1000

O bloqueio das membranas foi realizado com solução de PBS-T 0,2% (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,4, Tween-20 0,2%) com 5% de leite (sem gordura) ou com 5% de BSA. A membrana foi incubada com os anticorpos primários (Tabela 2) overnight a 4°C ou conforme as especificações da bula.

Tabela 3: Anticorpos secundários utilizados nos ensaios de western blotting, e suas diluições.

Anticorpo	Marca	Número Catálogo	Diluição
Anti-IgG Camundongo	GE Healthcare UK	NA931V	1:5000
Anti-IgG Coelho	GE Healthcare UK	NA934V	1:5000

Após 3 lavagens de 10 min cada com PBS-T 0,02%, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-coelho ou anticorpo anti-camundongo durante 1 hora à temperatura ambiente.

Após incubação com os anticorpos secundários (Tabela 3), as membranas foram lavadas 3 vezes / 10 min com TBS-T 0,02%, e em seguida reveladas com kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) e expostas ao filme (Amersham Hyperfilm ECL).

14. Superexpressão do gene LC3 fusionado a GFP em células de melanoma humano através de lentivírus

Para geração de células de melanoma humano com expressão forçada do gene LC3 fusionado ao GFP foram utilizados plasmídios contendo a construção GFP-LC3. O vetor lentiviral utilizado foi o pLV e as sequências foram inseridas no mesmo. O sistema utilizado para empacotamento lentiviral foi o Mission shRNA (Sigma, USA).

Inicialmente, os plasmídeos lentivirais contendo a sequência do gene de interesse foram transfectados juntamente com os plasmídeos empacotadores nas células HEK 293T, de acordo com instruções do fabricante. Os plasmídeos lentivirais sem a sequência de interesse foram utilizados para a geração dos controles. O empacotamento viral gera as partículas virais inativas que são secretadas no meio de cultura das células HEK 293T. As linhagens de melanoma humano ou células primárias foram então infectadas com este título

viral e os clones transduzidos selecionados de acordo com o plasmídeo utilizado, sendo que os clones GFP-LC3 são selecionados através de fluorescência (GFP). A eficiência da expressão gênica forçada foi confirmada por citometria de fluxo no canal FL2 – 620nm com citômetro FACSCanthon (BD Biosciences, CA, USA).

15. Ensaio Clonogênico ou Ensaio de Formação de Colônias

Foram plaqueadas 5000 células em placas de cultura de células de 6 poços. Após 24h, as células, já aderidas, foram tratadas com os compostos 2-ME nas concentrações de 0,1 μ M e 0,5 μ M e RES nas concentrações de 1 μ M, 2 μ M e 5 μ M, ou somente com o veículo (DMSO) e mantidas em cultura por 14 dias, sendo o tratamento realizado novamente após 7 dias.

Após este período o meio de cultura foi descartado, as placas lavadas com tampão fosfato salino (PBS), e as colônias formadas foram coradas com solução de glutaraldeído 6% e cristal violeta 0,5% diluídos em PBS. As placas foram fotografadas para comparação do crescimento das colônias nos diferentes tratamentos em relação ao controle não tratado.

16. Esferóides

Os esferóides de melanoma foram preparados utilizando-se o método de agarose. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo agarose (UltraPure Agarose – Life Technologies) 1,5% na concentração de $2,5 \times 10^3$ células por poço. As placas foram incubadas por 72h até que os esferóides se formassem. Estes foram coletados em tubo falcon utilizando pipetas P1000. O meio foi removido e os esferóides foram implantados em 400 μ L de solução de colágeno de rato tipo 1 (BD, Biosciences, edford, MA) gelificados com meio de cultura Ham's F12 (Life Technologies) (10X) e tampão de reconstituição (2,2% NaHCO₃, NaOH 0,05M, HEPES 200mM). Após a solidificação do colágeno com os esferóides embebidos foi adicionado 1mL de DMEM contendo 10% de SBF por poço overnight. No dia seguinte o meio foi removido e o tratamento foi realizado com 2ME nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M levando-se em consideração o volume de colágeno presente no poço.

Após 5 dias de tratamento o meio foi removido e os esferóides foram lavados com PBS por 10 minutos e incubados por 1h a 37°C com Calceína-AM e etídeo homodímero-1 (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit, Life Technologies). Após este tempo tirou-se fotografia dos esferóides em um microscópio invertido de fluorescência Nikon-300 utilizando o software NIS-Documents.

17. Imunofluorescência

Após o emblocamento das peles reconstituídas em parafina e da confecção das lâminas com os cortes histológicos foi realizado o ensaio de imunofluorescência para detecção de proteínas específicas. As lâminas parafinizadas foram incubadas a 60°C por 3h e então desparafinizadas e hidratadas (Xilol – 2x 10min, Etanol 100% - 2x 10min, Etanol 90% - 2x 10min, Etanol 70% - 2x 10min e PBS – 2x 10min). Após a etapa de hidratação foi realizada a recuperação antigênica em panela de vapor por 30 minutos a 95°C em tampão citrato pH6,0 (Dako Cytomation #S2369). Após o resfriamento das lâminas à temperatura ambiente elas foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com Etanol 80% a 4°C por 15 minutos. Após estes passos os cortes foram delimitados com caneta especial (ImmEdge Pen – Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) para menor gasto de anticorpos.

As imunofluorescências realizadas em células cultivadas em lamínulas não foram submetidas ao tratamento descrito acima. Células foram plaqueadas (5×10^4 células por poço) em lamínulas estéreis colocadas em placas de 12 poços. Após 72h de crescimento o meio de cultura foi retirado e, na própria placa as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com formalina 3,7%. A partir da fixação das lamínulas foram novamente lavadas com PBS e então o procedimento foi o mesmo que o realizado nas lâminas.

Foi realizado bloqueio com soro de cabra por 1h à temperatura ambiente e então houve a incubação com os diferentes anticorpos primários (Tabela 4) a 4°C até o dia posterior. As lâminas foram lavadas 3 vezes de 5 min com PBS + 0,2% Tween 20 e então incubadas por 1h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário específico.

Tabela 4: Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência, e suas diluições utilizados, bem como os anticorpos secundários.

Anticorpo	Marca No. Cat.	Secundário	Diluição
BrdU	GE Helthcare UK RPN20AB	Camundongo	1:100
Citoqueratina 10	AbCam ab1421	Camundongo	1:150
Citoqueratina 14	AbCam ab7800	Camundongo	1:300
Filagrina	AbCam ab24584	Coelho	1:1000
HMB45	AbCam ab787	Camundongo	1:20
Involucrina	AbCam ab27495	Coelho	1:1000
Laminina	Santa Cruz sc25341	Camundongo	1:50
MelanA	AbCam ab785	Camundongo	1:20
MitF	AbCam ab12039	Camundongo	1:20
Tubulina	Sigma-Aldrich T5168	Camundongo	1:1000

Após esta incubação as lâminas foram lavadas 3 vezes de 5min com PBS + 0,2% Tween 20 e montadas com Vectashield contendo DAPI (Vector Lab Inc.). No caso das lâminas que foram submetidas a dupla marcação, houve incubação com um segundo anticorpo primário por 2h à temperatura ambiente, 3 lavagens de 5min com PBS + 0,2% Tween 20 e incubação por 1h com o anticorpo secundário específico. Após 3 lavagens de 5 min com PBS + 0,2% Tween 20, estas lâminas foram montadas da mesma forma que as anteriores.

18. Obtenção de linhagens resistentes e duplo-resistentes

Células de melanoma humano das linhagens Sk-Mel-19, Sk-Mel-28, Sk-Mel-29 e UACC-62 (Figura 3, coluna esquerda) comportam a mutação V600E no gene que codifica a proteína BRAF. Esta mutação torna esta proteína constitutivamente ativa, o que ativa a via de sinalização de ERK, que por sua vez leva a uma proliferação aumentada. O composto PLX4032 (Vemurafenibe) é um inibidor desta proteína mutada que é utilizado na clínica para o tratamento de tumores que possuem esta mutação, porém, como mencionado anteriormente, estes tumores adquirem resistência ao Vemurafenibe pela ativação compensatória de outras vias de sinalização que levam à resistência das células e crescimento do tumor, levando os pacientes a óbito.

As células foram tratadas continuamente com concentrações crescentes de Vemurafenibe, iniciando por 0,3 μ M. Duas vezes por semana o meio de cultura foi trocado. Quando as células voltavam a adquirir confluência nas

placas de cultura, a concentração de Vemurafenibe foi aumentada para 0,5 μ M, 1,0 μ M e até 3,0 μ M para a linhagem Sk-Mel-19, e até 6,0 μ M para as linhagens Sk-Mel-28, Sk-Mel-29 e UACC62. As linhagens resistentes foram então sempre mantidas na presença do Vemurafenibe e foram nomeadas Sk-Mel-19R, Sk-Mel-28R, Sk-Mel-29R e UACC62R (Figura 3, coluna central). Como observado na Figura 3, algumas alterações morfológicas podem ser notadas, como maior pigmentação nas linhagens Sk-Mel-19R e Sk-Mel-29R e maior espalhamento do citoplasma nas linhagens Sk-Mel-28R e UACC62R.

Após a obtenção das linhagens de melanoma resistentes, deu-se início ao tratamento destas células continuamente com o inibidor de MEK1 e MEK2, o Trametinibe. As linhagens Sk-Mel-19R, Sk-Mel-28R, Sk-Mel-29R e UACC62R foram tratadas inicialmente com 10 η M deste composto. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana, e quando as células se tornavam confluentes na placa, a concentração foi aumentada para 30 η M e 100 η M nas linhagens Sk-Mel-19R, Sk-Mel-28R e Sk-Mel-29R. A linhagem UACC62R se mostrou muito sensível ao tratamento, e a obtenção da linhagem duplo-resistente ainda não foi possível. As linhagens duplo-resistentes foram então mantidas na presença de Vemurafenibe e Trametinibe, e foram denominadas Sk-Mel-19RT, Sk-Mel-28RT e Sk-Mel-29RT (Figura 3, coluna direita). É possível notar algumas alterações morfológicas em relação às células resistentes apenas ao PLX4032, como por exemplo, a maior pigmentação da linhagem Sk-Mel-29RT em relação à linhagem Sk-Mel-29R.

Figura 3: Linhagens celulares de melanoma humano metastático que contém a proteína BRAF V600E. Coluna da esquerda, células parentais. Coluna central, células resistentes ao PLX4032. Coluna da direita, Células duplo-resistentes ao PLX4032 e Trametinib. Magnificação de 100X.

19. Coloração para β -galactosidase associada à senescência

As células de melanoma foram plaqueadas em baixa confluência (5×10^4 células por poço) em placas de 6 poços. No dia seguinte, após a adesão das células, estas foram tratadas com diferentes concentrações de 2ME. Após o tempo de tratamento as células foram fixadas para a coloração da β -

galactosidase, tiveram seu tratamento renovado, ou foram incubadas com meio de cultura sem 2ME. Para as células que foram fixadas, o tratamento foi realizado por 3 dias ou 5 dias. Para as células que foram mantidas em tratamento, a manutenção do 2ME foi por 5 dias + 3 dias (com ou sem 2ME), e então estas células foram fixadas. A fixação e coloração da β -galactosidase associada à senescência foi realizada utilizando o kit Senescence β -galactosidase Staining Kit #9860 (Cell Signaling Technology) seguindo as instruções da bula.

20. Pele reconstituída contendo melanoma como modelo biomimético de invasão

Para a reconstrução da pele artificial nós seguimos o protocolo de acordo com Brohem et al, 2012. Resumidamente, os equivalentes dérmicos foram preparados com $1,5 \times 10^5$ fibroblastos em meio a uma matriz de colágeno tipo 1 (BD, Biosciences, edford, MA). Após a polimerização do equivalente dérmico, foram plaqueados $1,5 \times 10^5$ queratinócitos e 10^4 melanócitos na presença ou ausência de 50×10^4 células de melanoma sobre o equivalente dérmico. Após a contração do gel de colágeno a estrutura foi transferida para uma tela de aço permitindo uma interface ar-líquido. A parte inferior fica em contato com o meio de cultura que consiste de 67.5% de DME, 22.5% de Ham's F12; 10% de Soro Fetal de Cabra, 5 μ g/mL Apo-Transferrina (T-1147, Sigma, Saint Louis, MO, USA), 5 μ g/mL de Insulina (I-1882, Sigma), 0.4 mg/mL de hidrocortisona hemisuccinato-21-(H-4881, Sigma), 1 ng/mL de EGF (fator de crescimento epidermal humano, 13247-010, Gibco/ Invitrogen,), e 0.1 nM de Toxina Colérica (3012, Sigma). Depois de 2 semanas nesta interface os tratamentos foram adicionados por 72 horas. A pele reconstituída foi lavada com PBS (pH 7,4) e emblocadas em OCT para cortes e análise da histologia.

PADRONIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

1. Padronização do tempo de tratamento do ensaio de formação de colônias

Para a padronização do ensaio de formação de colônias, as células foram plaqueadas em placas de 60mm e deixadas sob cultivo durante diferentes períodos de tempo (Figura 4). Após este ensaio, decidiu-se utilizar o tempo de 15 dias de cultivo, pois nele seria mais fácil observar a diferença de crescimento entre as células tratadas e não tratadas.

Figura 4: Crescimento de colônias de células da linhagem de melanoma humano #9 em durante diferentes períodos de tempo, para padronização do ensaio clonogênico.

Duas formas diferentes de tratamento foram realizados nas células e estão ilustrados na figura 5. Após o plaqueamento as células foram tratadas com os diferentes compostos nas concentrações indicadas, e as placas foram coradas após 14, sem renovação de tratamento (Figura 5A). A figura 5B mostra o mesmo ensaio realizado com renovação do tratamento sete dias após o inicial. Nota-se que a diferença entre as células tratadas e não tratadas é maior no segundo protocolo, que foi utilizado para os ensaios.

Figura 5: Diferentes protocolos de tratamento das células com os compostos. A – sem renovar o meio de cultura contendo os compostos. B – Renovando o meio de cultura contendo os compostos 7 dias após o primeiro tratamento.

2. Imunofluorescência para padronização de marcação de células de linhagens de melanoma

Determinar quais os marcadores de melanoma e as linhagens mais eficientemente responsivas às marcações é importante para o presente trabalho, pois a identificação de células de melanoma é necessária para experimentos que utilizam o ambiente tridimensional da pele reconstituída.

Para tal padronização, diversas linhagens de melanoma metastático humano foram utilizadas, e estas linhagens continham diferentes mutações e características genéticas. As linhagens utilizadas foram Sk-Mel-19, Sk-Mel-28, Sk-Mel-29, Sk-Mel-103, Sk-Mel147, Sk-Mel-173, UACC62 e WM1366. Os ensaios de imunofluorescência foram realizados com os anticorpos primários anti-MelanA, anti-MitF e anti-HMB45 (marcação verde) e o marcador nuclear DAPI (marcação azul) (Figura 6). Para o controle negativo da reação, as células foram incubadas somente com os anticorpos secundários, sem serem previamente incubadas com os anticorpos primários.

As linhagens Sk-Mel-19 e Sk-Mel-29 foram fortemente marcadas no controle negativo (Figura 6, primeira coluna), desta forma as marcações com os anticorpos em questão foi desconsiderada, e foi dada prioridade à utilização outras linhagens nos experimentos envolvendo pele reconstituída.

O anticorpo anti-MitF não se mostrou eficiente para a detecção das células de melanoma, não levando a marcação de nenhuma das linhagens celulares utilizadas (Figura 6, terceira coluna). Desta forma, não se utilizou o mesmo para a detecção de melanomas na pele.

Um anticorpo que mostrou alguma eficiência de marcação foi o HMB45, marcando fortemente as linhagens Sk-Mel-19, Sk-Mel-28, Sk-Mel-29 e Sk-Mel-173 (Figura 6, quarta coluna). Em duas destas linhagens (Sk-Mel-19 e Sk-Mel-29) a marcação não é confiável, pois houve reação do anticorpo secundário no controle negativo, porém, para as linhagens Sk-Mel-28 e Sk-Mel-173 esta pode ser uma opção para a detecção dos melanomas no ambiente tridimensional.

A maior eficiência para detecção das células de melanoma foi dada pelo anticorpo anti-MelanA. Este anticorpo marcou todas as linhagens celulares, sem exceção (Figura 6, segunda coluna). Em apenas uma das linhagens celulares esta marcação foi fraca (Sk-Mel-103). Caso esta linhagem celular seja utilizada nos experimentos da pele reconstituída, novas padronizações com concentrações maiores do anticorpo devem ser utilizadas.

Resumidamente, com exceção das linhagens Sk-Mel-19 e Sk-Mel-29, todas as linhagens podem ser utilizadas para os experimentos de pele artificial. O anticorpo anti-MelanA se mostrou especialmente eficiente para a marcação das células de melanoma humano metastático utilizadas, sendo um bom candidato para a detecção destas células nos experimentos tridimensionais.

Figura 6: Imunofluorescência das linhagens de melanoma humano metastático indicadas realizadas com os anticorpos MelanA, MitF e HMF45. Notar a eficiência do anticorpo anti-MelanA na marcação de todas as linhagens celulares utilizadas, mostrando sua possível utilização para a identificação de melanomas nos ensaios futuros a serem realizados com a pele reconstituída. Fotografias adquiridas com magnitude de 200X.

3. Padronização da pele reconstituída para ensaios tridimensionais

A pele reconstituída foi padronizada e, como é possível observar na figura 7 A e C, houve diferenciação da camada da epiderme, sendo evidente a presença de queratinócitos desde a camada basal até a formação de uma camada córnea. A derme também está presente e é possível observar a presença de fibroblastos nesta camada.

A figura 7 B e D mostra a pele reconstituída tratada com o 2ME na concentração de 5 μ M a partir do sétimo até o último (décimo-primeiro) dia de diferenciação. Como é possível observar, a estrutura da epiderme é mantida, sendo possível identificar as diferentes camadas da epiderme, desde a camada basal até a camada córnea. Parece haver alguma diferença na quantidade de fibroblastos presentes na derme, sendo menor na pele tratada com o 2ME, porém estes ainda estão presentes como é possível notar na figura.

Estes resultados mostram que a concentração utilizada de 2ME é adequada para os ensaios de pele artificial. Desta forma, os ensaios seguintes foram realizados com a presença de células de melanoma na pele, para verificar a ação do 2ME na contenção da proliferação e invasão destas células no modelo de pele reconstituída.

Figura 7: Pele artificial reconstituída tratada com veículo (A e C) e 2ME na concentração de 5μM (B e D). Em ambos os casos é possível observar a diferenciação da epiderme em diversas camadas, desde a camada basal até a camada córnea.

CAPÍTULO 1

RESVERATROL

1. Resveratrol e câncer

O Resveratrol (RES – Figura 8), ou *trans*-3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbeno é um polifenol natural encontrado em plantas como uva, frutas vermelhas, amendoim, nozes, pinhas e outras plantas medicinais (Larrosa et al. 2003, Athar et al. 2007, Smoliga et al. 2011). Este composto é uma fitoalexina produzida pela enzima stilbeno sintase (Athar et al. 2009) em plantas superiores em resposta a infecções por patógenos (Delmas et al. 2006) ou em resposta a adversidades climáticas, condições de estresse como exposição a ozônio, alta incidência de luz solar, metais pesados, e deprivação de nutrientes (Niles et al. 2003, Baur and Sinclair 2006, Athar et al. 2009, Kim et al. 2011)

Figura 8: Estrutura química do Resveratrol

O Resveratrol foi primeiramente isolado na década de 1940 das raízes da planta *Veratum grandiflorum* O. Loes (Takaoka 1940) no Japão. Pouca importância foi dada ao RES até que em 1992 a sua presença foi descoberta no vinho tinto, e efeitos cardioprotetores foram atribuídos ao mesmo (H. 1992). Desde então, diversos artigos vêm mostrando seu efeito na prevenção ou no retardamento da progressão de diversas doenças humanas (Baur and Sinclair 2006, Vang et al. 2011), como doenças cardiovasculares (Hung et al. 2000), obesidade (Dal-Pan et al. 2010), diabetes tipo 2 (Palsamy and Subramanian

2008), além de efeitos neuroprotetores (Wang et al. 2002), modulação de resposta inflamatória (Chen et al. 2005), e até no retardamento do envelhecimento e aumento do tempo de vida de organismos unicelulares (Howitz et al. 2003) até vertebrados (Wood et al. 2004).

Em 1997, Jang e colaboradores demonstraram o efeito do RES na prevenção da carcinogênese em camundongos (Jang et al. 1997). Neste estudo, a aplicação tópica do composto diminuiu o número de tumores na pele em até 98%, e como consequência, o estudo dos efeitos anti-tumorais do resveratrol aumentou muito (Baur and Sinclair 2006). Estes estudos demonstraram efeito em diversos tipos tumorais, *in vitro* e *in vivo*, bloqueando a iniciação, promoção e progressão da tumorigênese. Além disso, demonstrou-se o seu efeito na prevenção de diversos tipos de tumor, como de pele, gástrico e coloretal, de pulmão, mama, próstata, hepatoma, neuroblastoma, fibrosarcoma, pancreático e leucemia (Baur and Sinclair 2006, Athar et al. 2007, Athar et al. 2009).

Estudos verificaram o efeito do RES como possível tratamento de tumores de diversos tipo e origens, como câncer de mama, próstata, colon, pancreático, hepatoma, espinocelular, ovário, tireóide, gástrico, entre outros. Estes tumores, quando tratados com este composto, têm diversas vias de sinalização alteradas, mostrando que ele tem efeito sobre diversos alvos, que culminam em diferentes respostas celulares, principalmente de morte celular por apoptose e parada no ciclo celular (Baur and Sinclair 2006, Athar et al. 2007, Athar et al. 2009). Além destes efeitos, já foi demonstrado que este composto é capaz de modular a angiogênese, inibir a invasão tumoral, inibir a metástase e modular danos no DNA (Athar et al. 2009, Vang et al. 2011).

Quanto aos efeitos na proliferação, o RES é capaz de levar à parada na fase G1/S do ciclo celular induzindo proteínas como p21^{Cip1} e p27^{Kip1}, e inibindo ciclinas e Cdks específicas desta fase (Kim et al. 2006, Athar et al. 2009). Dependendo do tipo celular este composto pode levar também à parada do ciclo celular na fase S e G2/M pela inibição de Cdk7 e da kinase p34Cdc2 (Joe et al. 2002, Liang et al. 2003, Athar et al. 2009). Fica claro que o efeito anti-proliferativo depende de características das células tratadas e da concentração de Resveratrol utilizada (Athar et al. 2009). Diversos estudos mostram que a inibição da proliferação celular é seguida da morte celular por apoptose,

mostrando que o resveratrol modula vias de sinalização de morte celular e outras vias de sobrevivência das células. Em diversos casos foi verificado que a indução de apoptose está associada à ativação de p53 (Shankar et al. 2007) seguido do aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax, Bak, PUMA, Noxa e Bim, e da inibição de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL e Mcl-1, resultando na ativação da via intrínseca da apoptose, levando à clivagem de caspase-3 culminando na morte programada por apoptose (Park et al. 2001, Athar et al. 2009).

Os estudos do efeito do RES em melanomas são escassos, e parte destes estudos foram realizados com a linhagem murina B16F10. Alguns efeitos observados após o tratamento foram inibição do potencial de migração e da invasão destas células através da diminuição da expressão da proteína Akt (Bhattacharya et al. 2011). Um estudo mostrou também indução de apoptose e parada no ciclo celular de células B16F10 quimiorresistentes a doxorrubicina (Gatouillat et al. 2010). Ensaio com células de proveniência humana mostram um efeito do Resveratrol na indução de apoptose e de parada no ciclo celular (Niles et al. 2003, Larrosa et al. 2003, Hsieh et al. 2005), porém, como revisado por Athar e colaboradores, em ensaios *in vivo*, o tratamento com RES não leva à regressão do tumor, e sim ao retardamento significativo do crescimento (Athar et al. 2007, Bhattacharya et al. 2011). Não há estudos comparando o efeito desta molécula entre melanomas e células primárias da pele, e também não há estudos do efeito deste composto em uma grande variedade de linhagens de melanoma humano com diferentes mutações.

Outro potencial efeito do Resveratrol pode ser o de terapêutica adjuvante. Em um estudo recente, Lin e colaboradores mostraram o efeito do Resveratrol na potencialização do efeito terapêutico da temozolamida em gliomas malignos pela inibição da autofagia (Lin et al. 2012). Neste estudo, o Resveratrol co-administrado em doses baixas levou à inibição do processo autofágico graças ao potencial anti-oxidante deste composto. Esta inibição na autofagia foi acompanhada de um incremento na morte celular por apoptose das células tratadas com temozolamida (Lin et al. 2012). Em um estudo *in vivo* com linhagem de melanoma murinho B16F10 resistente a Doxorrubicina, a menor dose de Resveratrol administrada em camundongos foi a que levou a maior efeito na inibição do crescimento tumoral (Gatouillat et al. 2010). O RES

pode adquirir papel pró-oxidante ou anti-oxidante dependendo da concentração utilizada e do tipo celular envolvido (Holme and Pervaiz 2007, Lin et al. 2012), e é possível que esta concentração e o ambiente celular no qual a molécula se encontra dite os alvos moleculares e os efeitos que o Resveratrol desempenhará nos modelos nos quais ele é empregado.

Dado o efeito do Resveratrol em diversas vias de sinalização, é importante verificar o efeito desta fitoalexina no melanoma em processos que ainda não foram investigados neste modelo, como a autofagia, e efeito no crescimento de colônias. Após estes estudos será mais fácil determinar a forma pela qual o Resveratrol regula e influencia tantas vias de sinalização intracelulares neste modelo, e elucidar como este composto pode ser empregado sozinho ou como adjuvante no modelo de pesquisa de melanomas para melhores resultados no tratamento desta malignidade.

RESULTADOS

1. Citotoxicidade do RES por Azul de Tripán.

A citotoxicidade foi testada para o RES por ensaio de azul de tripan. As células primárias e linhagens de melanomas foram tratadas por 24h, 48h e 72h com diferentes concentrações deste composto

É importante ressaltar que, para estes experimentos, foram utilizadas diferentes culturas primárias provenientes de pacientes diferentes, mostrando que as respostas destas células devem-se ao tipo celular e não a um indivíduo específico. Queratinócitos primários imortalizados (HaCaT) também foram utilizados para este teste de citotoxicidade, mas não tiveram resposta semelhante aos queratinócitos primários aqui mostrados, e assim foram excluídas dos experimentos seguintes (Figura 9).

Figura 9: Citotoxicidade do Resveratrol em linhagens de queratinócito imortalizadas HaCaT.

O Resveratrol mostrou citotoxicidade seletiva para as linhagens de melanoma. A indução de morte nas linhagens de melanoma Sk-Mel-19, Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147 chegou a 47%, 78% e 75% respectivamente, quando estas foram tratadas por 72h na concentração de 100µM. Nas mesmas condições de tratamento os melanócitos tiveram taxa de mortalidade de 35%,

os queratinócitos 30%, os fibroblastos 15% e os melanomas Sk-Mel-28 e Sk-Mel-173 mostraram valores de 15% e 22% de morte, respectivamente (Figura 10). A mesma concentração de Resveratrol foi capaz de induzir cerca de 50% de morte nas linhagens de melanoma Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147 em 48h, e cerca de 40% na linhagem Sk-Mel-19, enquanto esta taxa não chega a um máximo de 30% nas células primárias (melanócitos) (Figura 10). Da mesma forma, na concentração de 50 μ M é possível ver indução de morte de cerca de 40% em 72h para as linhagens de melanoma Sk-Mel-19 e Sk-Mel-147, e essa indução de morte não pode ser observada em nenhuma das linhagens primárias nessas condições (Figura 10). Além do efeito dose dependente que se observa na figura 10 é possível notar também um efeito tempo dependente nas linhagens Sk-Mel-19, Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147 (Figura 11).

Figura 10: Efeito dose dependente do 2ME nas células primárias e linhagens de melanoma humano após 24h 48h e 72h.

Figura 11: Efeito tempo dependente do RES nas células primárias e linhagens de melanoma humano.

Fica claro que o Resveratrol tem um efeito citotóxico seletivo para linhagens de melanoma, principalmente Sk-Mel-19, Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147.

Podemos observar células tratadas por 72h com Resveratrol na concentração de 100μM (Figura 12 e 13). O Resveratrol levou a uma alta citotoxicidade (cerca de 80%) nas linhagens de melanoma Sk-Mel-103 e Sk-

Mel-147, e (cerca de 50%) na linhagem de melanoma Sk-Mel-19, e pode-se notar que as células que ainda estão aderidas apresentam alteração morfológica, mostrando um aspecto mais alongado em relação às células não tratadas. Mesmo as células de cultura primária e as da linhagem de melanoma Sk-Mel-28 e Sk-Mel-173, que não sofreram um efeito citotóxico tão evidente com o tratamento (~15% e ~20% respectivamente), mostram uma diminuição no número de células aderidas, podendo também refletir uma inibição da proliferação causada por este composto. (Figuras 12 e 13).

Figura 12: Fotos das células primárias e de melanoma Sk-Mel-19 tratadas com o composto 2-metoxiestradiol por 72h na concentração de 100 μ M. Aumento de 100x.

Figura 13: Fotos das células primárias e de melanoma Sk-Mel-28 Sk-Mel-103 Sk-Mel-147 e Sk-Mel-173 tratadas com o composto Resveratrol por 72h na concentração de 100μM. Aumento de 100x.

2. Citotoxicidade por indução de apoptose analisada por citometria de fluxo

O tratamento das células da linhagem de melanoma Sk-Mel-103 foi realizado também com o RES nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M pelos períodos de 48h e 72h. O ensaio mostra o aumento da população de células positivas para AnexinaV com o aumento da concentração e tempo de exposição ao composto (Figura 14).

A quantificação das populações analisadas por citometria de fluxo foram plotadas em histograma, que pode ser observado na figura 15. Fica claro o efeito citotóxico dose dependente nas células tratadas por 48h (Figura 15A), bem como a presença de uma população de células necróticas (~20%) nos tratamentos por 72h com o RES na concentração de 100 μ M, incrementando assim o número total de células mortas (Figura 15B).

Figura 14: Dot-plot das células marcadas com Anexina-APC e PI e submetidas a citometria de fluxo após tratamento com RES nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M por 48h e 72h.

Figura 15: Histograma da quantificação dos eventos mostrados no Dot-plot da citometria de fluxo das células de melanoma Sk-Mel-103 tratadas por 48h (A) e 72h (B) com RES nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M.

3. Indução da apoptose verificada por clivagem de caspase

A apoptose pode ser mediada por uma família de enzimas denominadas de caspases. Estas estão inativas no citosol e com a sua clivagem, se tornam ativas e, então, são capazes de clivar/degradar diversas proteínas necessárias para o funcionamento celular. A ativação da caspase-9 por sua clivagem mostra a participação da via intrínseca da apoptose, que ocorre com participação da despolarização da membrana externa mitocondrial. Na figura 16 observa-se que há a clivagem da caspase-9 na linhagem de melanoma humano Sk-Mel-103, quando tratadas com Resveratrol a 50 μ M e 100 μ M por 48h e 72h.

Figura 16: Imunoblotting da proteína que participa da vida apoptótica Caspase-9, na linhagem de melanoma Sk-Mel-103 após tratamento com RES por 48h e 72h.

Na figura é possível observar um efeito tempo dependente para o tratamento, já que as bandas do tratamento por 72h aparecem mais intensas que em 48h. Da mesma forma, observa-se um efeito dose-dependente, tendo a forma clivada de caspase-9 mais intensa no tratamento com 100µM em relação ao tratamento com 50µM (Figura 16).

Como controle foi utilizado Doxorrubicina, uma droga que possui uma larga descrição na literatura por induzir a morte por apoptose dependente de caspases. Esta clivagem, no entanto, só ficou evidente no tratamento por 72h.

4. Ensaio de formação de colônias

As células foram tratadas por duas semanas com concentrações sub-tóxicas do composto Resveratrol. Estas concentrações foram escolhidas por não levarem a nenhum tipo de interferência na viabilidade celular, possibilitando verificar assim o efeito destes compostos em doses baixas, no crescimento em longo prazo das linhagens de melanoma utilizadas.

O tratamento com o Resveratrol mostrou um efeito inibitório muito tênue no crescimento das colônias de linhagens de melanoma humano, como é possível observar após a coloração das placas (Figura 17). A quantificação das colônias (Figura 18) não mostra diferença expressiva entre os tratamentos com o composto.

Neste caso, fica claro que o Resveratrol precisa ser utilizado em doses mais altas para levar a um efeito de inibição de crescimento, não sendo eficaz para a inibição do crescimento de melanomas em doses sub-tóxicas.

Figura 17: Crescimento de colônias de fibroblastos primários e linhagens de melanoma humano após tratamento com RES nas concentrações indicadas.

Figura 18: Quantificação do número de colônias formadas em uma das replicatas dos ensaios de formação de colônias.

5. Contagem do número total de células para análise de proliferação

Uma forma de verificar o efeito dos tratamentos na proliferação celular é contar o número total de células presentes (vivas e mortas) após diferentes períodos de exposição aos compostos, nas concentrações desejadas.

O efeito do tratamento com o RES no número total de células foi semelhante ao do 2ME, exceto pela indução da proliferação a baixas doses por 24h de exposição como mostrado por formação de colônias. Observa-se que mesmo após tratamento por 24h, as doses mais altas do Resveratrol (50 μ M e 100 μ M) levam a uma inibição no número total de células, de forma mais expressiva em algumas linhagens de melanoma como Sk-Mel-28, Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147 (Figura 19). Este efeito mostra-se tempo dependente, já que o tratamento por períodos de 48h e 72h inibem ainda mais a proliferação, refletindo um número total de células menor mesmo na concentração de 10 μ M (Figura 19). Esses valores chegam à inibição do número total de células de 50% ou maiores no caso de 72h, para todos os tipos celulares, mostrando que

independente da morte celular, o crescimento das células é inibido por este composto a 100 μ M (Figura 19).

A Figura 20 mostra os diferentes tipos celulares tratados com o Resveratrol. É possível verificar uma resposta de inibição de proliferação tempo dependente principalmente em melanócitos, queratinócitos e melanomas humanos Sk-Mel-19, Sk-Mel-103 e Sk-Mel-173. Da mesma forma, é possível observar nestes tipos celulares, um efeito dose dependente do tratamento com RES.

Figura 19: Efeito do RES administrado nas concentrações acima indicadas no número total de células após 24h, 48h e 72h de exposição ao composto.

Figura 20: Número total de células nas diferentes culturas primárias e linhagens de melanoma humano após tratamento com RES nas diferentes concentrações por 24h, 48h e 72h.

CAPITULO 2

2-METOXIESTRADIOL

1. 2-Metoxiestradiol e câncer

O 2-Metoxiestradiol (2ME) (Figura 21) é um produto natural derivado do esteróide estradiol pelo metabolismo do 17β -Estradiol efetuado pelo citocromo P450 dependente de NADH, (Fotsis et al. 1994, Kirches and Warich-Kirches 2009, Parks et al. 2011). Não se sabia de sua atividade biológica até que em janeiro de 1994, D'Amato e colaboradores mostraram sua interação com a tubulina no sítio da colchicina, inibindo sua polimerização e inibindo angiogênese. Em março do mesmo ano, Fotsis e colaboradores mostraram que este composto era o que apresentava maior citotoxicidade em células endoteliais de capilares dentre diversos metabólitos do estradiol, deixando claro o seu efeito na inibição de angiogênese em tumores *in vivo*, e a supressão do crescimento de tumores.

Desde então, este composto foi testado *in vitro* em uma grande diversidade de tipos de tumores, como gliomas (Chen et al. 2008, Kirches and Warich-Kirches 2009), carcinoma de colo (Parks et al. 2011); carcinoma pancreático (Qanungo et al. 2002); leucemia (Gao et al. 2005) e células tumorigênicas de epitélio de mama MCF-7 (Stander et al. 2010), mostrando efeitos anti-angiogênicos, indutores de apoptose e anti-proliferativos, mas seu efeito mostra-se diferente dependendo do modelo.

Figura 21: Estrutura química do 2-Methoxiestradiol

Recentemente foi descrita a capacidade de inibir a angiogênese por suprimir a dinâmica de polimerização de tubulina de células endoteliais, e diminuir as expressões de HIF-1 α (Hipóxia Inducible Factor 1 α) e VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor) (Stander et al. 2010). Além disso, tem efeito na indução de apoptose em diversas linhagens tumorais, sendo capaz de ativar os caminhos intrínseco e extrínseco da apoptose (Parks et al. 2011) como resultado do aumento da expressão de DR5 (Death Receptor 5), da inativação das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL, e da ativação dos sinalizadores JNK (c-Jun N-terminal Kinase), ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) e p38-Kinase (Fukui and Zhu 2009, Stander et al. 2010). Finalmente, seu efeito anti-proliferativo mostra uma não progressão na mitose, ou seja, uma parada na fase G2/M do ciclo celular (Stander et al. 2010, Parks et al. 2011, Kirches and Warich-Kirches 2009, Ghosh et al. 2003), e dependendo do modelo celular pode haver aumento de ciclina B1 e p21, que controlam a progressão no ciclo celular (Ghosh et al. 2003, Parks et al. 2011).

Outros efeitos do 2ME que podem contribuir para a atividade anti-tumoral são a sua capacidade de aumentar a quantidade de espécies reativas de oxigênio pela inibição da enzima SOD (superoxide dismutase) (Gao et al. 2005, Chen et al. 2008) e a de aumentar o processo autofágico em células tratadas (Chen et al. 2008, Stander et al. 2010, Parks et al. 2011).

Em melanoma, o efeito anti-tumoral do 2ME já foi verificado em alguns trabalhos. Um deles mostra o efeito no bloqueio do ciclo celular em G2/M bem como a indução de apoptose em apenas uma linhagem celular humana (WM-98-1) cultivada *in vitro* (Ghosh et al. 2003). Outro mostra o efeito *in vitro* em oito linhagens de melanoma humano, causando a morte por apoptose dependente da via intrínseca bem como o bloqueio da progressão no ciclo celular na fase G2/M, e *in vivo*, uma das linhagens foi injetada no baço, e o tratamento levou à regressão do tumor primário bem como a diminuição de metástase para o fígado (Dobos et al. 2004).

As vias induzidas pelo 2-ME ainda não estão inteiramente elucidadas, e dependendo do tipo tumoral estas respostas são diferentes (Chen et al. 2008). A participação do processo autofágico na indução de morte celular induzido pelo 2-ME parece ser muito importante em outros tipos tumorais (Chen et al. 2008, Stander et al. 2010, Parks et al. 2011), e a importância deste processo

na quimiorresistência já foi descrito em diversos artigos, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*, podendo ser crucial neste modelo (Janku et al. 2011). Além disso, a explicação mais detalhada destas vias e o seu efeito em linhagens celulares de melanoma de diferentes origens e características genéticas, bem como seu efeito na quimiorresistência destas linhagens, ainda merecem esforço científico para serem elucidados.

RESULTADOS

1. Citotoxicidade do 2ME por MTT

Os ensaios de citotoxicidade por MTT foram realizados em $n=8$ para as linhagens de melanoma SK-Mel-28, SK-Mel-103 e SK-Mel-147 e para os fibroblastos FF287. Já o melanócito primário (MP#22) foi testado apenas uma vez. As linhagens foram cultivadas com este composto nas concentrações de $1\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$ por 24h, 48h e 72h.

Pelos resultados da densidade ótica em relação ao controle de cada uma das linhagens no ensaio de MTT nota-se que para todas as linhagens em 48h e 72h o 2-ME mostra um efeito citotóxico. Esse efeito é maior na linhagem de melanoma Sk-Mel-103 e não se mostra dose-dependente para nenhuma das diferentes linhagens. No tempo de 24h há uma tendência ao aumento da densidade ótica em todas as linhagens exceto no melanoma Sk-Mel-147, mostrando um efeito proliferativo após o primeiro dia de tratamento com o 2-ME (Figura 22).

Figura 22: Efeito citotóxico do 2-ME em células primárias e de melanoma por MTT.

Apesar de apresentar efeito citotóxico pela metodologia do MTT a observação das células (e os resultados obtidos por azul de tripan que serão apresentados a seguir) nos mostra a ausência de células mortas no sobrenadante. A diminuição da densidade ótica observada neste ensaio pode então ser devida à uma diminuição do número total de células, levando a um menor metabolismo do MTT em formazan. Assim sendo, os resultados aqui apresentados podem refletir uma inibição da proliferação e não a citotoxicidade propriamente dita do composto. Um menor número de células pode ser observado nas placas após 72h de tratamento refletindo o efeito da inibição da proliferação induzido pelo composto 2-ME. Nesse caso é necessário realizar o ensaio de citotoxicidade por azul de tripan para verificar a indução de morte celular.

Uma das réplicas do ensaio de MTT foi realizada também em concentrações superiores a 10 μ M. Porém, devido a um efeito de aumento da densidade ótica em relação ao controle nessas concentrações, e um efeito na morfologia das células igual ao da concentração de 10 μ M, os ensaios com as concentrações superiores foram descontinuados (Figura 23).

Figura 23: Ensaio sem replicatas da citotoxicidade do 2ME com concentrações superiores a 10 μ M, mostrando um aumento da densidade ótica não condizente com a quantidade de células observadas nas placas, justificando o uso de 10 μ M como concentração máxima de 2ME nos experimentos seguintes.

2. Citotoxicidade do 2ME por Azul de Tripán

A citotoxicidade foi então testada para o 2ME por ensaio de azul de tripan. As células primárias e linhagens de melanomas foram tratadas por 24h, 48h e 72h com diferentes concentrações destes compostos.

É importante ressaltar que as culturas primárias utilizadas foram provenientes de diferentes pacientes, mostrando que as respostas destas células devem-se ao tipo celular e não a um indivíduo específico. Queratinócitos primários imortalizados (HaCaT) também foram utilizados para este teste de citotoxicidade, mas não tiveram resposta semelhante aos queratinócitos primários aqui mostrados. O 2ME mostrou um grande efeito citotóxico nesta linhagem (Figura 24).

Figura 24: Citotoxicidade do 2ME no queratinócito imortalizado HaCaT.

Como esperado, os resultados da citotoxicidade do 2ME obtidos por azul de tripan foram diferentes daqueles obtidos pela metodologia do MTT. O 2-ME mostrou pouco efeito tóxico sobre quase todas as células tratadas, tanto primárias quanto de melanomas, chegando a um máximo de 20% de morte celular na concentração de 10µM em 72h nos queratinócitos e nas linhagens de melanoma Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147 (Figura 25). As linhagens com maiores taxas de morte celular foram as de melanoma Sk-Mel-19, chegando a aproximadamente 80%, e melanoma Sk-Mel-173, chegando a aproximadamente 30%, ambas na concentração de 10µM em 72h. É possível

notar também que há uma leve tendência a um efeito dose dependente e tempo dependente em todas as linhagens de melanoma testadas (Figura 25 e 26). Dentre as células primárias, os queratinócitos são as que apresentam maior taxa de morte celular quando tratadas com o 2ME, porém mesmo as células não tratadas apresentam uma taxa basal de morte celular de cerca de 10%, dessa maneira, a morte observada para essas culturas primárias tratadas com o composto não se deve somente ao composto utilizado.

Figura 25: Efeito dose dependente do 2ME nas células primárias e linhagens de melanoma humano após 24h 48h e 72h.

No tratamento com 2-ME é possível notar drástica alteração morfológica nas células primárias de melanócito e fibroblasto em relação ao controle, as células perdem o aspecto alongado e mostram seu citoplasma mais espalhado e uma morfologia mais trapezoidal. Da mesma forma, as linhagens de melanoma mostram um maior espalhamento do citoplasma, bem como uma diminuição do número total de células podendo refletir uma inibição da proliferação causada pelo 2-ME (Figuras 27 e 28).

Figura 26 – Efeito tempo dependente do 2ME nas células primárias e linhagens de melanoma humano.

Figura 27: Fotos das células primárias e de melanoma Sk-Mel-19 tratadas com o composto 2-metoxiestradiol por 72h na concentração de 10 μ M. Aumento de 100x.

Figura 28: Fotos das células primárias e de melanoma Sk-Mel-28, Sk-Mel-103, Sk-Mel-147, e Sk-Mel-173 tratadas com o composto 2-metoxiestradiol por 72h na concentração de 10μM. Aumento de 100x.

3. Ensaio de formação de colônias

As células foram tratadas por duas semanas com concentrações sub-tóxicas de 2-ME. Estas concentrações foram escolhidas por não interferirem na viabilidade celular.

O tratamento com o 2ME foi realizado, inicialmente, com as concentrações de 0,1 μ M e 0,5 μ M. A formação de colônias mostrou-se levemente inibida no tratamento com a concentração de 0,1 μ M, porém o efeito foi extremo no tratamento com a concentração de 0,5 μ M, onde observa-se a inibição quase total do crescimento de colônias nas linhagens de melanoma humano, mostrando o potencial deste composto inibir o crescimento destas células em doses baixas (Figura 29).

Figura 29: Crescimento de colônias de fibroblastos primários e linhagens de melanoma humano após tratamento com 2ME nas concentrações indicadas.

Apesar da inibição na formação de colônias ser evidente, a contagem de colônias foi realizada em uma replicata experimental, mostrando que não há alteração na formação de colônias para os Fibroblastos primários, nem para as linhagens de melanoma tratadas com 0,1 μ M de 2ME. Já na concentração de 0,5 μ M o 2ME leva a uma inibição drástica número de colônias formadas nas placas de melanomas (Figura 30).

Figura 30: Quantificação do número de colônias formadas em uma das replicatas dos ensaios de formação de colônias.

É interessante observar que este efeito é seletivo para as linhagens de melanoma humano, já que o mesmo não ocorre para as células de fibroblastos primários (Figuras 29 e 30).

Ensaio similar foi realizado também com outras linhagens de melanoma humano, para verificar se o composto demonstrava o mesmo efeito. Como é possível observar na figura 31, diferentes linhagens de melanoma mostram maior ou menor sensibilidade ao 2ME na formação de colônias. A linhagem M245 teve a formação de colônias quase totalmente inibida na concentração de 0,3 μ M enquanto na linhagem M318, para observar o mesmo efeito, foi necessário tratamento com 1,0 μ M do composto (Figura 31).

Como apontado acima, a aquisição de resistência após tratamento com quimioterápicos ou terapias específicas direcionadas (como o Vemurafenib) são um grande problema na contenção da progressão tumoral e tratamento de melanomas. Este fato motivou o ensaio de formação de colônias com linhagens de melanoma resistentes a Vemurafenibe e duplo resistentes a Vemurafenibe + Trametinibe tratadas com o 2ME (Figura 32).

Figura 31: Crescimento de colônias de diferentes linhagens de melanoma humano após tratamento com 2ME nas concentrações indicadas.

É interessante observar que da mesma forma que nas linhagens não resistentes, as linhagens resistentes e duplo resistente testadas mostraram inibição quase total da formação de colônias na dose de 1,0 μ M de 2-ME (Figura 32), dose esta que não leva à morte celular após 72h de tratamento, como constatado pelo ensaio de azul de tripan.

Figura 32: Crescimento de colônias de diferentes linhagens de melanoma humano resistente ou duplo resistente após tratamento com 1,0µM de 2-ME.

4. Contagem do número total de células

Uma forma de verificar efeito dos tratamentos na proliferação celular é contar o número total de células presentes (vivas e mortas) após diferentes períodos de exposição aos compostos, nas concentrações desejadas.

Figura 33: Efeito do 2ME administrado nas concentrações acima indicadas no número total de células após 24h, 48h e 72h de exposição ao composto.

A figura 33 mostra o número total de células após tratamento das diferentes células primárias e linhagens de melanoma humano com diferentes concentrações de 2ME por 24h, 48h e 72h. O tratamento com o 2ME pode inicialmente levar a uma indução de proliferação quando administrado em doses baixas em alguns tipos celulares, porém com o aumento da concentração, bem como com o aumento do tempo de exposição, fica clara a diminuição do número total de células. Mesmo em doses que não levam à morte celular é possível observar uma inibição de cerca de 80% do número total de células, como é observado para as linhagens de melanoma humano Sk-Mel-103, Sk-Mel-147 e Sk-Mel-173 após 72h de tratamento com concentrações de 0,5 μ M, 1 μ M e 10 μ M. É possível observar também que, apesar de não terem sofrido morte celular, o 2ME diminui o número total de células primárias, porém de modo não tão expressivo quanto as linhagens de melanoma humano, como observado nos gráficos de 48h e 72h. Estes resultados explicam a inibição da proliferação, e apóiam o uso do 2ME como anti-proliferativo em melanomas humanos mesmo em doses subletais

A Figura 34 mostra as diferentes linhagens celulares tratadas com o 2-metoxiestradiol em gráficos separados, onde fica mais claro o efeito tempo dependente dos tratamentos na proliferação celular, principalmente nas linhagens de melanoma humano. Da mesma forma é possível notar inibição expressiva no número total de células na concentração de 10 μ M de 2ME. Fica evidente também nesta figura, o efeito mais pronunciado da inibição de proliferação nas linhagens de melanoma humano em relação às células primárias, mostrando a especificidade do composto.

Figura 34: Número total de células nas diferentes culturas primárias e linhagens de melanoma humano após tratamento com 2ME nas diferentes concentrações por 24h, 48h e 72h.

5. Curvas de Crescimento

Uma outra forma utilizada para avaliar o efeito do 2-ME na proliferação celular foi a realização de curvas de crescimento na presença de diferentes concentrações deste composto. As células foram plaqueadas e coletadas para contagem após 1, 3, 5 e 7 dias de tratamento com o 2-ME nas concentrações sub-tóxicas de 0,5 μ M e 1 μ M.

Tempo de Dobramento

2ME []	0.0 μ M	0.5 μ M	1.0 μ M
SK-Mel-28	44.90h	57.82h	70.58h
SK-Mel-103	50.43h	119.1h	99.20h
SK-Mel-147	34.55h	80.62h	324.1h
SK-Mel-173	35.22h	50.55h	430.0h

Figura 35: Curvas de crescimento e tempos de dobramentos das linhagens de melanoma humano indicadas após tratamento com 2ME nas concentrações de 0,5 μ M e 1 μ M.

Os gráficos foram montados de acordo com os valores obtidos nas contagens celulares, e os tempos de dobramento das diferentes linhagens e tratamentos foram calculados. É possível observar uma inibição significativa entre o crescimento das células após tratamento com 2ME na concentração de

1 μ M em todas as linhagens. Nas linhagens Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147, esta diferença já é significativa na concentração de 0,5 μ M (Figura 35).

Os tempos de dobramento calculados, como esperado, aumentam quando as células são tratadas com 2ME. Sem tratamento os valores do tempo de dobramento estão entre 30h e 50h. Quando as células são mantidas na concentração de 0,5 μ M de 2ME estes valores ficam entre 50h e 120h, e na concentração de 1,0 μ M de 2ME o tempo de dobramento fica entre 70h e 430h, mostrando que a duplicação da população células é mais lenta na presença do 2ME, ficando nítido o efeito dose dependente (Figura 35).

6. Ensaio de Alamar Blue e IC50

O ensaio de Alamar Blue, assim como o ensaio de MTT, é um ensaio de citotoxicidade que mede metabolismo celular pela redução de Resazurina a Resofurina na presença de NADH. Sendo assim, este ensaio não mede somente a indução de morte, mas também a inibição da proliferação nas células.

Os experimentos de Alamar Blue foram realizados após tratamento das células com 2-ME em concentrações de 0,01 μ M a 30 μ M por 3, 5 ou 7 dias. Os resultados mostram inibição da proliferação e viabilidade celulares de forma dose dependente (Figura 36). Após plotagem dos dados nos gráficos, foram plotadas curvas ajustadas (ou *fit curves*) para o cálculo dos valores de IC50 (Figura 37).

Nas figuras 36 e 37 é possível observar que após 3 dias de tratamento com 2-ME já é observada uma inibição na proliferação em todas as linhagens. Observa-se também que, em todos os tempos nos quais os ensaios foram realizados, as linhagens Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147 mostraram-se mais sensíveis ao 2-ME.

A tabela 5 tem os valores de IC50 para as linhagens testadas após 3, 5 e 7 dias. Estes valores evidenciam a maior sensibilidade das linhagens Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147, cujos IC50 estão abaixo de 1,0 μ M, enquanto os valores de IC50 das linhagens Sk-Mel-28 e Sk-Mel-173 estão entre 2,0 μ M e 20 μ M.

3 DIAS

5 DIAS

7 DIAS

Figura 36: Gráficos da inibição de proliferação verificados por ensaio de Alamar Blue, após tratamento das linhagens indicadas com 2ME por 3 dias, 5 dias e 7 dias.

3 DIAS

5 DIAS

7 DIAS

Figura 37: Gráficos da inibição de proliferação (preto) e suas curvas ajustadas ou *fit curves* (vermelho), após tratamento das linhagens indicadas com 2ME por 3 dias, 5 dias e 7 dias.

Como descrito anteriormente, as linhagens Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147, que se demonstraram mais sensíveis ao 2ME, possuem uma característica comum: presença de BRAF selvagem e NRAS com mutação Q16R. Por possuírem esta característica em comum, a hipótese de que a presença desta mutação específica pudesse conferir maior sensibilidade das células ao 2-ME foi levantada. Outras linhagens de melanoma humano com esta substituição específica foram testadas (Figura 38). Os resultados mostram que, mesmo entre as 6 linhagens testadas, há diferença na sensibilidade ao composto. As linhagens WM1366 e M244 se mostraram mais sensíveis que as linhagens M202, M207, IPC298 e M368. Desta forma, conclui-se que o efeito do 2ME não depende das mutações presentes nas células e as linhagens NRAS mutadas não são necessariamente mais sensíveis.

Tabela 5: Valores de IC50 para as linhagens de melanoma humano indicadas após tratamento com 2ME por 3 dias, 5 dias e 7 dias.

	IC 50 (μM)			
	Sk-Mel-28	Sk-Mel-103	Sk-Mel-147	Sk-Mel-173
3 Days	2,744	0,2425	0,7008	19,56
5 Days	6,819	0,5473	0,519	7,635
7 Days	4,406	0,3368	0,686	6,709

Figura 38: Gráficos da inibição de proliferação de linhagens de melanoma humano com a substituição NRAS Q16R após tratamento com 2ME por 3 dias.

7. Análise da externalização de fosfatidilserina e permeabilidade da membrana celular (Anexina V e Iodeto de Propídeo) por citometria de fluxo

Células de melanoma Sk-Mel-103 foram tratadas com 2ME a 10 μ M por 48h e 72h, coletadas e incubadas com Anexina-APC e Iodeto de Propídeo para análise de morte celular por apoptose. Este ensaio mostrou a presença de células apoptóticas principalmente após 72h de tratamento. Como pode ser observado no quadrante inferior direito, 30% das células são positivas para Anexina-V, mostrando a externalização da Fosfatidilserina, indicando a indução deste tipo de morte celular programada (Figura 39).

Figura 39: Dot-plot das células marcadas com Anexina-APC e PI e submetidas a citometria de fluxo após tratamento com 2ME na concentração de 10 μ M por 48h e 72h.

Na figura 40 é possível notar o aumento da porcentagem de células apoptóticas em 72h de tratamento com 2ME em relação ao tratamento por 48h, mostrando o efeito tempo dependente da citotoxicidade deste composto.

Figura 40: Histograma da quantificação dos eventos mostrados no Dot-plot da citometria de fluxo das células de melanoma #9 tratadas por 48h (A) e 72h (B) com 2ME na concentração de 10 μ M.

8. Externalização de fosfatidilserina e potencial de membrana mitocondrial (Anexina V e TMRM) por citometria de fluxo

Trabalhos anteriores já verificaram a indução da morte celular programada do tipo apoptose pelo composto 2-metoxiestradiol, inclusive em melanoma. No caso aqui descrito, a indução de apoptose foi testada pela verificação, com a Anexina V, da externalização do fosfolípido fosfatidilserina, e, com o tetrametilrodamina metil ester (TMRM), que mostra alterações no potencial da membrana mitocondrial, que também está relacionado com a morte por apoptose.

Em doses baixas de 2ME (0,5 μ M and 1,0 μ M), a porcentagem de células positivas para Anexina V não foi muito expressiva, chegando a valores acima de 25% somente na linhagem Sk-Mel-147. Somente nas linhagens Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147 a morte por apoptose alcançou valores acima de 50%, como observado pela marcação com Anexina V. Entretanto, isto só aconteceu quando as células foram tratadas com concentrações de 5,0 μ M and 10,0 μ M de 2ME, que são valores muito mais altos que as doses necessárias para a inibição da proliferação (Figura 41).

Figura 41: Análise da indução de apoptose por marcação com Anexina V e TMRM (despolarização de membrana mitocondrial) após tratamento com as doses indicadas de 2ME por 5 dias.

Resultados similares foram observados na marcação com TMRM. O potencial de membrana mitocondrial não foi comprometido por baixas doses de 2ME (0,5 μ M e 1,0 μ M), exceto na linhagem Sk-Mel-147, onde houve perda desta marcação em cerca de 30% das células após tratamento com 1,0 μ M de 2ME. Nas doses mais altas (5,0 μ M e 10,0 μ M) deste composto, a porcentagem de células com despolarização da membrana mitocondrial chegou a valores próximos de 40% em todas as linhagens celulares (Figura 41, gráficos da direita).

Fica demonstrado então, que baixas doses de 2ME não causam quantidade expressiva de morte por apoptose.

9. Indução da via de sinalização da apoptose

As cysteine-aspartic-acid-proteases (Caspases) são proteases essenciais para o processo apoptótico. A Caspase-9 é uma caspase iniciadora, que, quando clivada se torna ativa, e capaz de clivar outras proteínas, dentre elas as Caspases efetoras (Caspases 3 e 7), as ativando, o que culmina na apoptose celular. Estas estão inativas no citosol e, com a sua clivagem, se tornam ativas e, então, são capazes de clivar/degradar diversas proteínas necessárias para o funcionamento celular.

Para confirmar a indução de apoptose por baixas concentrações de 2ME, as células foram tratadas com este composto por 3, 5, 7 e 9 dias. Os resultados dos western blottings são mostrados nas figuras 42, 43, 44 e 45. Estes resultados mostram que, mesmo levando à morte celular por apoptose em uma baixa porcentagem das células, o 2ME foi capaz de modular proteínas envolvidas neste processo de morte celular programada, como pode ser observado nas figuras.

A clivagem de *Poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) pela caspase 3 gera um fragmento de 89KDa, que é utilizado como um marcador da indução de apoptose. Como verificado nas figuras 42 a 45, as linhagens Sk-Mel-28, Sk-Mel-147 e Sk-Mel-173 mostram aumento deste produto de PARP clivado em ao menos um dos tempos de tratamento. Esta clivagem pode ser induzida mesmo por concentração de 0,5 μ M de 2ME, como em 3 dias na linhagem Sk-Mel-147 (Figura 42), e em 5 dias na linhagem Sk-Mel-173 (Figura 43).

Figura 42: Western blotting após 3 dias de tratamento com 2ME.

Figura 43: Western blotting após 5 dias de tratamento com 2ME.

Figura 44: Western blotting após 7 dias de tratamento com 2ME.

Figura 45: Western blotting após 7 dias de tratamento com 2ME.

Uma outra proteína envolvida no processo apoptótico é a *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2). Ela faz parte da família de reguladores da apoptose, atuando como uma inibidora deste processo. No caso do tratamento com 2ME, pode ser observado que no tempo de 3 dias, ela é inibida nas linhagens Sk-Mel-147 e Sk-Mel-173 (Figura 42). Em tempos de tratamento mais longos, não é observada a sua modulação pelo 2ME.

Como ilustrado nas figuras 42 a 45, há um aumento na clivagem de caspases -3, -7 e -9 induzido por 2ME em todas as linhagens celulares. Por exemplo, em 3 dias (Figura 42), isto fica muito evidente na linhagem Sk-Mel-28, onde o tratamento com 1,0 μ M de 2ME induz a clivagem das três caspases mencionadas.

Apesar dos ensaios de citometria de fluxo não evidenciarem um aumento expressivo da morte por apoptose, este processo está sendo induzido em baixas concentrações do composto 2ME, como evidenciado nas figuras de western blotting.

10. Análise da indução de vacúolos autofágicos

Células de melanoma humano da linhagem Sk-Mel-103 foram estavelmente transfectadas com GFP-LC3 e tratadas com puromicina para seleção das células que expressavam a proteína fluorescente. Estas células foram tratadas com 2ME a 1,0 μ M por 24h, 48h e 72h, e avaliadas sob microscopia de fluorescência para verificar formação de vesículas com GFP-LC3 (Figura 46). Nota-se que após 24h já há um aumento de pontos de fluorescência mais intensa no citoplasma da célula, e isto fica ainda mais pronunciado após 48h e 72h.

Estes resultados mostram que o processo autofágico é induzido pelo 2ME nestas condições na linhagem SK-Mel-103.

Figura 46: Linhagem de melanoma humano Sk-Mel-103 transfectada com GFP-LC3 sob microscopia invertida após tratamento com 2ME nas condições indicadas, mostrando a formação de vacúolos autofágicos. Aumento 160X.

11. Indução de vesículas ácidas

As células da linhagem Sk-Mel-103 também foram utilizadas para a verificação de vesículas ácidas, pois a indução do processo autofágico gera vacúolos que se fundem com lisossomos, formando maior quantidade de vesículas acidificadas, que fluorescem em vermelho com o corante “Acridine Orange”.

Nota-se que após tratamento com 2ME na concentração de 10 μ M já é possível observar um aumento na formação destas vesículas em 48h em relação ao controle não tratado (Figura 47). Após 72h de tratamento é possível notar um aumento da fluorescência vermelha mesmo nas células tratadas com

1,0 μ M de 2ME, mostrando indução deste processo mesmo em baixas concentrações do composto.

Figura 47: Linhagem de melanoma humano Sk-Mel-103 após tratamento com 2ME nas condições indicadas, e incubadas com o corante *Acridine Orange*, mostrando a formação de vesículas ácidas em vermelho. Controle sem tratamento fotografado após 72h. Aumento 100X.

12. Proteínas associadas à regulação do processo autofágico

A proteína LC3 existe em sua forma citoplasmática (LC3-I) ou lipídada, ligada a membranas do vacúolo autofágico (LC3-II). A indução de autofagia leva ao aumento da isoforma lipídada, mostrando que há maior quantidade de vacúolos autofágicos nas células.

No intuito de verificar este processo, um ensaio piloto de western blotting foi realizado, onde células da linhagem Sk-Mel-103 foram tratadas com 2ME na presença ou ausência de inibidores do processo autofágico. É possível notar na figura 48 que o 2ME na concentração de 10 μ M é capaz de aumentar a isoforma lipídada de LC3 (banda inferior), mostrando uma indução do processo autofágico após 72h de tratamento. Nota-se também que o inibidor de autofagia Bafilomicina (Baf) leva a um acúmulo de LC3-II. Este acúmulo ocorre porque a Baf inibe a fusão do autofagossomo com o lisossomo, levando a um acúmulo de vacúolos autofágicos quando este processo está induzido.

Figura 48: Western Blotting da proteína LC3 em linhagem de melanoma Sk-Mel-103 após 72h de tratamento nas condições indicadas, mostrando as duas isoformas da proteína: citoplasmática (LC3-I) e lipídada (LC3-II).

Para a confirmação desta indução outras proteínas relacionadas ao processo autofágico foram analisadas, como a proteína p62/SQTM1, Beclin-1 e ATG-5. A presença da proteína LC3 também foi analisada em outras linhagens de melanoma humano.

Figura 49: Western Blotting para a proteína p62/SQTM1 em diferentes linhagens de melanoma humano tratadas com as concentrações indicadas de 2ME por 3 dias.

A proteína p62/SQTM1 (p62) forma agregados proteicos que são degradados no processo autofágico, desta forma, a indução do processo autofágico leva ao aumento desta degradação, diminuindo assim a expressão desta proteína na célula. A figura 49 mostra uma replicata experimental de western blotting realizado para a proteína p62 em células tratadas com 2ME por 3 dias e o gráfico da quantificação da intensidade das bandas. Com exceção da linhagem Sk-Mel-28 todas as células testadas mostram uma diminuição da quantidade desta proteína, o que indica aumento do processo autofágico. Por outro lado, esta indução ocorre somente quando as células são tratadas com 10 μ M de 2ME, concentração com efeitos citotóxicos, e muito mais alta que as concentrações necessárias para a inibição da proliferação celular.

A iniciação do processo autofágico depende de diversas proteínas que o regulam, dentre elas estão Beclin-1 e ATG-5. A indução do início do processo autofágico eleva a expressão destas proteínas, porém, conforme ilustrado na

figura 50, o tratamento com o 2ME não modulou os seus níveis nem quando concentrações altas (10 μ M) foram utilizadas para tratar as células. A proteína LC3 também foi testada em outras linhagens celulares diferentes da testada anteriormente, e não foi observada indução de sua forma lipídica (LC3-II ou LC3-B) nem mesmo na linhagem Sk-Mel-103, onde esta lipidação já havia sido mostrada anteriormente, mostrando que a iniciação do processo autofágico não é fortemente induzida pelo 2ME mesmo em concentrações citotóxicas.

Figura 50: Western Blotting para as proteínas Beclin-1, LC3 e ATG-5 em diferentes linhagens de melanoma humano tratadas com as concentrações indicadas de 2ME por 3 dias.

13. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Após serem verificados os efeitos na inibição do crescimento das células por Alamar Blue e por ensaio de formação de colônias, células da linhagem de melanoma Sk-Mel-103 foram tratadas com 2ME para análise do efeito deste composto no ciclo celular por citometria de fluxo.

As figuras 51 e 52 mostram a influência do 2ME na distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular, respectivamente após 24h e 48h de tratamento com o composto. O eixo das abscissas mostra a quantidade de DNA presente em cada evento, demonstrado pela marcação com iodeto de propídeo (PI), no eixo das ordenadas está plotado o número de eventos.

Figura 51: Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h de tratamento com o 2ME.

Observando as figuras 51 e 52 fica evidente o aumento da população na fase G2/M do ciclo celular quando as células são tratadas com 10µM de 2ME. Isto ocorre tanto por 24h (Figura 51) como por 48h (Figura 52). As concentrações mais baixas de 2ME mostram alteração no ciclo celular destas células, porém não de forma tão expressiva quando a concentração é de 10µM.

A figura 52 mostra uma parada das células na fase G2/M do ciclo celular na concentração de 1,0µM de 2ME. Fica evidente, também, o aumento da população com DNA fragmentado (Sub G1) após tratamento com o 2ME mesmo em baixas concentrações. Além disso, é possível observar aumento da

população de células poliplóides, com conteúdo de DNA maior que G2, tanto no tratamento com 1 μ M como 10 μ M de 2ME.

Figura 52: Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 48h de tratamento com o 2ME.

Com a análise de três experimentos independentes foi possível quantificar as populações de células nas diferentes fases do ciclo de forma comparativa, excluindo-se as células com conteúdo Sub G1 e poliplóides, como mostrado nas figuras 53 e 54, representando os dados referentes aos tratamentos por 24h e 48h respectivamente.

É possível notar em ambos os casos, a predominância de células na fase G1 do ciclo celular em todos os tratamentos, tanto em 24h como em 48h, exceto na presença de 2ME a 10 μ M, onde a predominância de células está na fase G2 do ciclo celular. É possível notar também um aumento na porcentagem de células em G1 nos tratamentos por 48h em relação à 24h, salvo pelo tratamento na maior concentração do composto (Figuras 53 e 54).

Figura 53: Gráfico de barras representando as populações de células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, após diferentes tratamentos por 24h.

Figura 54: Gráfico de barras representando as populações de células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular, após diferentes tratamentos por 48h.

Como controle, células foram privadas de soro fetal bovino, isto é, carenciadas, mostrando que há uma parada do ciclo celular em G1 tanto em 24h como em 48h de carenciamento (Figuras 53 e 54).

14. Análise de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular

Após verificar alteração no ciclo celular com parada na fase G2/M do ciclo celular, e aumento de população de células poliplóides, foram analisadas, por western blotting, as expressões de proteínas envolvidas no ciclo celular, especialmente no controle desta fase do ciclo.

A transição entre G2 para a mitose requer formação de complexo Cdc2/CiclinaB1. Este complexo é ativado por Cdc25, e pode ser inibido por Wee1 e p21^{Cip1}, dentre outras proteínas. A fosforilação nos resíduos S807/811 da proteína pRb é presente em células proliferativas, e a ausência desta fosforilação marca células não proliferativas, como células em G0, por exemplo (Ren and Rollins 2004).

Figura 55: Western Blotting de proteínas relacionadas à transição G2/M do ciclo celular em linhagens de melanoma humano tratadas com 1,0μM de 2ME pelos tempos indicados.

A figura 55 mostra a expressão destas proteínas mencionadas, após tratamento com 2ME a $1,0\mu\text{M}$ por diferentes tempos, de 1h a 72h. É possível notar modulação em diversas proteínas, e estas alterações variam conforme a linhagem celular utilizada. Por outro lado, em todas as linhagens há modulação de proteínas que culminam na inibição da proliferação.

Figura 56: Western Blotting de proteínas relacionadas à transição G2/M do ciclo celular em linhagens de melanoma humano tratadas com as concentrações indicadas por 5 dias.

A linhagem Sk-Mel-28, por exemplo, apesar de não mostrar inibição de pRB S807/811, tem aumento da expressão de $p21^{\text{Cip1}}$ e diminuição de Ciclina B1. Na linhagem Sk-Mel-103, é possível observar, além da inibição de fosforilação de pRB S807/811, um aumento em $p21^{\text{Cip1}}$ e inibição de Ciclina B1. A linhagem Sk-Mel-147 tem a inibição quase total da fosforilação nos resíduos S807/811 de Rb, e a diminuição de expressão de Ciclina B1 em 48h, e além disso, é observado um aumento expressivo de $p21^{\text{Cip1}}$. Por fim, a linhagem Sk-

Mel173 tem inibição de pRB S807/811, aumento da expressão de p21^{Cip1}, além de um aumento na expressão de Wee1, um inibidor do complexo Cdk/Ciclina responsável pela transição da fase G2 para a fase de Mitose do ciclo celular (Figura 55).

Para confirmar este efeito nas proteínas envolvidas na transição de G2/M do ciclo celular, as células foram tratadas por 5 dias com doses crescentes de 2ME, de 0,5µM a 10µM. Os western blottings mostram que em todas as linhagens há uma inibição de Ciclina B1 e de pRb S807/811, sendo que em algumas linhagens isso já pode ser observado em baixas concentrações do composto (0,5µM e 1,0µM). A proteína p21^{Cip1} está aumentada em todas as linhagens em concentrações até 1,0µM, exceto na Sk-Mel-147. Na linhagem Sk-Mel-147, a proteína p21^{Cip1} está aumentada somente em doses mais altas, enquanto nestas doses as outras linhagens tiveram sua expressão diminuída (Figura 56).

15. Outras proteínas relacionadas à proliferação

Outras vias de sinalização também regulam a proliferação celular. Um exemplo é a via de RAS/RAF/ERK. A proteína ERK fosforilada (p42/p44) induz fatores transcricionais nucleares e expressão de genes que induzem a proliferação. Um dos principais compostos anti-melanoma, o Vemurafenib, atua nesta via de sinalização, inibindo a proteína BRAFV600E, que é constitutivamente ativa e leva as células a proliferarem. Um ensaio de Western Blotting foi realizado após tratamento das células com 1,0µM de 2ME por tempos de 1h a 72h (Figura 57). Como é possível notar, o 2ME não levou a alterações na fosforilação desta proteína, assim é excluída a hipótese de que o 2ME inibe a proliferação celular também por esta via de sinalização.

Figura 57: Western Blotting de ERK e pERK em linhagens de melanoma humano tratadas com 1,0 μ M de 2ME pelos tempos indicados.

16. Ensaios para detecção de Senescência

Uma das hipóteses que explicaria a alteração morfológica das células e a expressiva inibição na proliferação é a indução de senescência celular, que tem um fenótipo característico de células com citoplasma mais espalhado, e que não se proliferam.

As células foram plaqueadas e tratadas com 2-ME por 5 dias e então coradas para evidenciar a β -galactosidase associada à senescência, em azul. Nota-se, além do menor número de células totais, uma maior quantidade de células com citoplasma espalhado e células com coloração azul intensa quando estas foram tratadas com 2ME (Figura 58), mostrando que este composto é um indutor de senescência.

Figura 58: Células das linhagens indicadas cultivadas por 5 dias na presença ou ausência de 1,0μM de 2ME coradas para β -galactosidase associada à senescência. Aumento 160X.

Uma proteína que caracteriza a senescência induzida pela ativação de oncogenes ou danos ao DNA é a Histona H3 trimetilada na lisina 9 (H3K9me3). Como mostrado por western blotting na figura 59, após o tratamento por 5 dias com 2ME, as linhagens de melanoma Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147 mostraram um aumento expressivo desta proteína, indicando que este processo está sendo induzido nestas células. O mesmo foi observado com menor expressividade na linhagem Sk-Mel-28. Por outro lado, este aumento só foi observado após tratamento com 10 μ M de 2ME, não sendo observadas alterações no nível de H3K9me3 quando as células foram tratadas com a dose mais baixa de 2ME.

Figura 59: Western blotting para a proteína Histona H3 trimetilada na lisina 9 (H3K9me3) em células tratadas por 3 dias com 2ME nas concentrações indicadas.

Com o objetivo de verificar a indução desta trimetilação na lisina 9 da histona H3 mesmo em concentrações baixas de 2ME foram realizados western blottings de células tratadas com este composto na concentração de 1,0 μ M por 1h a 72h. A observação deste western blotting mostra uma leve indução desta histona nas linhagens Sk-Mel-28, Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147, mostrando que esta alteração pode ser uma das respostas celulares que contribuem para o fenótipo senescente das células (Figura 60).

Um ponto importante é verificar se as células entram em senescência de forma irreversível, ou se após a retirada do composto, elas voltam a ser proliferativas, caracterizando quiescência. Para testar isso as células foram plaqueadas e tratadas por 5 dias com 2ME. Depois destes 5 dias elas foram mantidas na presença ou ausência de 2ME por 3 dias adicionais, e então coradas para evidenciar β -galactosidase associada à senescência. A figura 61 mostra este tratamento com diferentes concentrações de 2ME para células das

linhagens Sk-Mel-28, Sk-Mel-103 e Sk-Mel-173. Fica evidente, principalmente para a linhagem Sk-Mel-28 tratada com $1,0\mu\text{M}$ de 2ME que a senescência é induzida quando as células são mantidas na presença do 2ME (linha superior). Nota-se também que quando o 2ME é retirado pelos últimos 3 dias de tratamento (linha inferior), as células senescentes continuam presentes, e o fenótipo de senescência evidenciado pela coloração da β -galactosidase associada à senescência em azul ainda está presente. Isto mostra que mesmo após a retirada do 2ME por 3 dias, não há reversão da senescência induzida nas células no período de tempo analisado.

Figura 60: Western blotting para a proteína Histona H3 trimetilada na lisina 9 (H3K9me3) em células tratadas com $1,0\mu\text{M}$ de 2ME nos tempos indicados.

Figura 61: Células das linhagens indicadas cultivadas por 5 dias na presença de 0,5 μ M, 1,0 μ M ou 2,0 μ M de 2ME e depois por mais 3 dias na presença (fotos superiores) ou ausência (fotos inferiores) deste composto, e então coradas para β -galactosidase associada à senescência.

17. Efeitos na polimerização da Tubulina

Os efeitos do 2-ME na polimerização da tubulina já haviam sido descritos (D'Amato et al. 1994). Tal efeito foi observado *in vitro* inclusive em linhagem de melanoma (Dobos et al. 2004). Aqui foi verificado o efeito do 2ME na polimerização da tubulina por microscopia confocal. O ensaio de imunofluorescência foi realizado nas linhagens de melanoma humano Sk-Mel-28 (Figuras 62, 63, 64 e 65), Sk-Mel-103 (Figuras 66, 67, 68 e 69) e Sk-Mel-147 (Figuras 70, 71, 72 e 73) após tratamento com 2ME por 3 e 5 dias nas concentrações de 0,5 μ M e 1,0 μ M.

A coloração verde nas figuras 62 a 73 mostra a marcação para a tubulina, evidenciando os microtúbulos e filamentos desta proteína. Nota-se que após o tratamento com o 2ME, a disposição destas fibras é diferente. Após o tratamento, os feixes tornam-se mais densos, em alguns casos mais espessos, e a coloração verde mais intensa. Este efeito é observado em 3 dias no tratamento com 1,0 μ M de 2ME, principalmente nas linhagens Sk-Mel-28 e Sk-Mel-147 (Figuras 62, 63, 70, 71). Após 5 dias de tratamento, o efeito na estabilização da polimerização da tubulina é ainda mais evidente, e pode ser também observado na concentração de 0,5 μ M de 2ME (Figuras 64, 65, 68, 69, 72, 73). Nestes casos, em especial na maior concentração utilizada do composto, é possível observar morfologia celular alterada, com células maiores e com citoplasma mais espalhado, com tubulina disposta por toda a célula em túbulos densos e mais espessos que na ausência do tratamento.

É possível também observar presença de células multi-nucleadas, principalmente dentre as células com citoplasma mais espalhado e com microtúbulos que apresentam morfologia de polimerização mais estável, o que pode ser devido a defeitos na divisão celular e separação dos núcleos celulares durante a mitose.

Figura 62: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-28 após 3 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho - Actina.

Figura 63: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-28 após 3 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25 μ m.

Figura 64: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-28 após 5 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina

Figura 65: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-28 após 5 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25 μ m.

Figura 66: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-103 após 3 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina.

Figura 67: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-

Mel-103 após 3 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25 μ m.

Figura 68: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-103 após 5 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina.

Figura 69: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-

Mel-103 após 5 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25 μ m.

Figura 70: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-147 após 3 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina.

Figura 71: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-147 após 3 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25µm

Figura 72: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-Mel-147 após 5 dias de tratamento. Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina.

Figura 73: Efeito do 2-metoxiestradiol na polimerização da tubulina na linhagem Sk-

Mel-147 após 5 dias de tratamento. Sobreposição: Azul –DAPI. Verde – Tubulina. Vermelho – Actina. Barras - 25µm.

18. Efeito do 2-metoxiestradiol em Modelo de esferóides

A citotoxicidade também foi testada em modelo tridimensional de esferóides implantados em colágeno. Para isso as células cresceram livres de adesão em placa, aderindo-se umas às outras, formando pequenas esferas, que são similares a tumores em diversos aspectos, como distribuição de oxigênio e nutrientes. A expressão protéica também pode ser diferenciada dentro dos esferóides, dependendo da localização da célula e de sua proximidade à periferia da esfera (Hirschhaeuser et al. 2010).

Desta forma, o teste do composto 2ME neste modelo tridimensional mostra maior complexidade experimental, assemelhando-se um pouco mais a uma resposta esperada em um indivíduo.

Figura 74: Esferóides da linhagem Sk-Mel-28 tratados com concentrações de 1,0 μ M e 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).

Inicialmente, o 2ME foi testado em linhagens celulares “naïve”, ou seja, nunca antes expostas a nenhum outro composto. Estas linhagens testadas foram Sk-Mel-28, Sk-Mel-103, Sk-Mel-147 e Sk-Mel-173 (Figuras 74 a 77). O 2ME mostrou-se eficiente em todas elas, independentemente do status mutacional das células, causando em algumas linhagens, maior morte celular, e em outras menor invasão na matriz de colágeno.

Na linhagem Sk-Mel-28 (Figura 74), nota-se menor viabilidade, mostrada pela diminuição na fluorescência verde quando o esferóide é tratado com 2ME. Na linhagem Sk-Mel-103 (Figura 75), há um aumento na fluorescência vermelha após o tratamento com 5,0 μ M de 2ME, evidenciando a toxicidade deste composto nesta linhagem celular.

Figura 75: Esferóides da linhagem Sk-Mel-103 tratados com concentrações de 1,0 μ M e 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).

Nas linhagens Sk-Mel-147 e Sk-Mel-173, não é possível notar diferenças na intensidade das fluorescências verde ou vermelha, mas a alteração no

tamanho dos esferóides fica evidente após o tratamento com 2ME e ambas as concentrações utilizadas (Figuras 76 e 77).

Figura 76: Esferóides da linhagem Sk-Mel-147 tratados com concentrações de 1,0 μ M e 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).

O efeito no tamanho do esferóide traduz a capacidade das células invadirem a matriz de colágeno em volta do esferóide, mostrando que o composto 2ME, nestes casos, apesar de não ter alterado a viabilidade celular, alterou a capacidade de invasão.

A quantificação da fluorescência do experimento aqui ilustrado mostra que em quase todos os casos de tratamento com 2ME a morte celular nos esferóides é maior que no controle. Este fato é mostrado pelos valores de Fluorescência Vermelha/Fluorescência Verde maiores que 1. A figura 78 mostra que a proporção de células mortas em relação às células vivas aumenta quando as células são tratadas com 2ME, principalmente na concentração de 5,0 μ M.

Figura 77: Esferóides da linhagem Sk-Mel-173 tratados com concentrações de 1,0 μ M e 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).

Após ter mostrado efeito em linhagens nunca antes expostas a outros compostos, o 2ME foi testado em linhagens com a mutação BRAF V600E resistentes ao Vemurafenibe (inibidor da proteína mutada) e ao Vemurafenibe + Trametinibe (Inibidor de MEK1/2), para verificar se o 2ME continuava eficiente na contenção de células tumorais, mesmo quando estas mostravam resistência previamente adquirida.

As linhagens resistentes e duplo resistentes foram testadas comparativamente às suas contrapartidas parentais. Em todas as linhagens testadas, o 2ME mostrou algum efeito na viabilidade celular ou potencial de invasão na matriz de colágeno (Figuras 79 a 80).

A linhagem Sk-Mel-28 parental, por exemplo, já havia mostrado inibição de viabilidade em testes anteriores. Este resultado foi observado novamente,

como se nota na Figura 79. É interessante observar que a linhagem Sk-Mel-28R, resistente ao Vemurafenibe ($6,0\mu\text{M}$); e a linhagem Sk-Mel-28RT, duplo resistente ao Vemurafenibe ($6,0\mu\text{M}$) e Trametinibe ($0,1\mu\text{M}$), mostram maior potencial de invasão na matriz de colágeno em relação à linhagem parental. Mesmo com maior potencial invasivo e sendo resistentes aos compostos mencionados, estas linhagens mostraram inibição de viabilidade (maior fluorescência vermelha) e inibição expressiva da invasão celular no colágeno após o tratamento com $5,0\mu\text{M}$ de 2ME.

Figura 78: Quantificação da fluorescência de uma replicata experimental dos esferóides referente ao experimento ilustrado nas figuras 75 a 78. Valores da quantificação da fluorescência vermelha divididos pela fluorescência verde em relação ao controle (Valor = 1), dando assim a proporção de células mortas.

Figura 79: Esferóides das linhagens Sk-Mel-28, Sk-Mel-28R e Sk-Mel-28RT tratados com 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).

Figura 80: Esferóides das linhagens Sk-Mel-19 e Sk-Mel-19R tratados com 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).

Figura 81: Esferóides das linhagens Sk-Mel-29 e Sk-Mel-29R tratados com 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).

Resultados similares foram observados nas linhagens Sk-Mel-19, Sk-Mel-19R (Figura 80), Sk-Mel-29 e Sk-Mel-29R (Figura 81). Apesar das linhagens resistentes não mostrarem potencial invasivo expressivamente maior

que as linhagens parentais neste caso, nota-se um leve aumento do tamanho dos esferóides. Da mesma forma, a presença do 2ME levou à uma diminuição na viabilidade celular, como observado pelo aumento na fluorescência vermelha na linhagem Sk-Mel-19 (Figura 80) e pela diminuição na fluorescência verde após o tratamento com este composto nas linhagens Sk-Mel-19R (Figura 80), Sk-Mel-29 e Sk-Mel-29R (Figura 81). A diminuição nas dimensões do esferóide também é notável após o tratamento com o 2ME, principalmente nas linhagens Sk-Mel-29 e Sk-Mel-29R (Figura 81).

Figura 82: Esferóides da linhagem UACC62 tratados com 1,0 μ M ou 5,0 μ M de 2ME e coradas para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho).

A linhagem UACC62 mostrou maior sensibilidade ao 2ME que as linhagens de melanoma humano mostradas anteriormente. Na presença de 1,0 μ M do composto, já é possível notar um aumento na fluorescência vermelha, sendo que a indução de morte celular é ainda mais expressiva

quando os esferóides são tratados com $5,0\mu\text{M}$ de 2ME (Figura 82). Quando o ensaio foi realizado com a linhagem resistente UACC62R não foi observado o mesmo que nas outras linhagens resistentes. Os esferóides formados por estas células mostraram-se menores que os das células parentais. Em relação à sensibilidade ao 2ME, ela se mostrou menor em relação à linhagem parental, mostrando diminuição da viabilidade apenas após o tratamento com $5,0\mu\text{M}$ de 2ME (Figura 83).

Fica claro assim, que todas as linhagens, mesmo a UACC62 em menor escala, são sensíveis e são levadas à morte celular quando tratadas com 2ME, independente de resistências previamente adquiridas.

Figura 83: Esferóides da linhagem UACC62R tratados com $1,0\mu\text{M}$ ou $5,0\mu\text{M}$ de 2ME e corados para evidenciar células viáveis (verde) e inviáveis (vermelho)

A quantificação do experimento de esferóides, ilustrado nas figuras 79 a 83, está plotada no gráfico da figura 84. É possível notar que em todos os casos o tratamento com 2ME levou a maior proporção de morte celular nos esferóides quando comparados ao controle (valores maiores que 1) exceto na linhagem UACC62R tratada com 1 μ M de 2ME.

Figura 84: Quantificação da fluorescência de uma replicata experimental dos esferóides referente ao experimento ilustrado nas figuras 93 a 97. Valores da quantificação da fluorescência vermelha divididos pela fluorescência verde em relação ao controle (Valor = 1), dando assim a proporção de células mortas.

19. Efeito do 2-metoxiestradiol em Modelo de Pele Reconstituída

O efeito do 2-metoxiestradiol foi testado no modelo de pele reconstituída. Como mostrado anteriormente, a pele sem melanoma mostrou diferenciação de células de queratinócito na epiderme e o 2ME na concentração de $5,0\mu\text{M}$ não alterou sua diferenciação, nem a morfologia da derme. A figura 85 mostra a pele sem melanoma e corada com hematoxilina-eosina (HE) em diferentes aumentos, mostrando a derme e epiderme. A epiderme possui camada basal, com queratinócitos com núcleos maiores, extrato espinhoso e extrato granuloso, com queratinócitos em diferenciação, e camada córnea, com queratinócitos de núcleo pequeno ou ausente, e marcação forte com eosina. A derme é rica tanto em colágeno como em fibroblastos (Figura 85).

Figura 85: Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle) coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 100x (esquerda), 200x (centro) e 400x (direita).

Figura 86: Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Imunofluorescência para citoqueratina 10 (verde) e involucrina (vermelho). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).

As peles reconstituídas sem melanoma foram submetidas a imunofluorescência no intuito de caracterizar a diferenciação da epiderme e suas diferentes camadas, bem como a lâmina basal e células proliferativas (Figuras 86 a 90, 92 a 95, 97 a 100). Em todas estas peles os núcleos celulares foram marcados em azul com DAPI.

A marcação com a citoqueratina 10, evidencia em verde as camadas supra-basais do epitélio, marcando as camadas diferenciadas do epitélio. Da mesma forma, a involucrina marca em vermelho os queratinócitos dos estratos mais diferenciados, marcando todo o epitélio, exceto a camada basal (Figura 86).

Figura 87: Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Imunofluorescência para BrdU (verde) e Filagrina (vermelho). Aumento de 100x (superior), 200x (centro) e 400x (inferior).

Durante as últimas 24h de diferenciação das peles, elas foram incubadas com BrdU, para verificar a presença de células com síntese de DNA e em proliferação. Na figura 87 está evidenciada em vermelho a marcação com filagrina, que está presente nas camadas mais diferenciadas do epitélio. O anticorpo anti-BrdU foi utilizado nesta pele reconstituída para mostrar as células em proliferação. Fica claro que as células proliferativas estão presentes na camada basal do epitélio, evidenciando os queratinócitos que dão origem às camadas mais diferenciadas da epiderme. No aumento de 100X é possível

notar algumas poucas células da derme marcadas, mostrando que há fibroblastos na derme que estão em fase de síntese de DNA.

Da mesma forma que na figura anterior, a figura 88 mostra a marcação com filagrina em vermelho nas camadas mais diferenciadas do epitélio. Com o objetivo de evidenciar a membrana basal da epiderme, a imunofluorescência para laminina foi realizada. A marcação em verde evidencia esta proteína na membrana basal logo abaixo da camada basal de queratinócitos na epiderme. Nota-se também uma marcação inespecífica de laminina nas camadas mais diferenciadas do epitélio, porém mais fraca que na membrana basal.

Figura 88: Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Imunofluorescência para Laminina (verde) e Filagrina (vermelho). Aumento de 100x (superior), 200x (centro) e 400x (inferior).

Um outro marcador utilizado foi o MelanA, que evidencia as células de melanoma. Como esperado, não há marcação com este anticorpo na pele reconstituída sem células de melanoma (Figura 89, superior). Como mostrado anteriormente, a filagrina marca as camadas mais diferenciadas do epitélio (Figura 89, centro). Uma outra proteína de diferenciação investigada foi a citoqueratina 14, que marca as camadas mais basais e não diferenciadas do epitélio, como mostra a figura 89, linha inferior.

Figura 89: Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Imunofluorescência para MelanA (marcação de melanoma) em verde (superior), Filagrina em vermelho (centro) e citoqueratina 14 em verde (inferior). Aumento de 200x.

Os controles negativos foram incubados com PBS em vez dos anticorpos primários, e em seguida incubados com os anticorpos secundários fluorescentes utilizados neste experimento. A ausência de marcação nos controles negativos (Figura 90) mostra a especificidade da marcação.

Figura 90: Peles reconstituídas sem células de melanoma (controle). Controles negativos de imunofluorescência. Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).

A pele também foi reconstituída com a presença de células de melanoma humano da linhagem Sk-Mel-28. Nota-se inicialmente uma alteração na morfologia da pele. A diferenciação do epitélio está alterada, com menor número de camadas, não sendo possível distinguir as camadas basais, estrato espinhoso e estrato granuloso. Por outro lado, ainda é possível notar a presença de uma camada córnea (Figura 91).

Figura 91: Peles reconstituídas com células de melanoma da linhagem Sk-Mel-28 coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 100x (esquerda), 200x (centro) e 400x (direita).

Nota-se também a presença de focos de maior celularidade na derme, em regiões próximas à epiderme, evidenciando regiões nas quais as células tumorais estão invadindo a derme através da membrana basal (Figura 91).

Figura 92: Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 sem tratamento. Imunofluorescência para involucrina (vermelho). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).

A figura 92 mostra marcação de involucrina em vermelho. Esta proteína está presente em camadas diferenciadas do epitélio. Na pele reconstituída sem melanoma, ela se mostrou presente em todas as camadas do epitélio, exceto na basal (Figura 86). Na pele com melanoma, nota-se uma marcação mais branda de involucrina, e próxima às camadas mais basais, não estando presentes nos focos de células que invadem a derme, nem em focos de celularidade presentes nas camadas mais diferenciadas da epiderme (Figura 92). A citoqueratina 10 e a citoqueratina 14 não foram detectadas neste caso. Da mesma forma, a marcação contra BrdU foi inespecífica e mostrou precipitados por toda a pele, não sendo possível verificar núcleos de células proliferativas.

A reação com anticorpo anti-MelanA mostrou marcação (verde) específica nas áreas ricas em células de melanoma. Com esta coloração fica evidente que as regiões com maior celularidade na derme são de fato células de melanoma invadindo a matriz extracelular (Figura 93).

Figura 93: Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 sem tratamento. Imunofluorescência para o marcador de melanoma MelanA (verde). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).

A marcação de laminina (verde) evidencia a presença de membrana basal no limite entre a epiderme e a derme das peles reconstituídas na presença de células da linhagem Sk-Mel-28. Esta membrana basal é

degradada pelas células de melanoma e, através dela, as células tumorais invadem a derme, formando focos de invasão (Figura 94). A mesma figura mostra a presença da filagrina em vermelho. Da mesma forma que na pele sem melanoma, a filagrina marca somente as camadas mais distantes da camada basal, mostrando maior diferenciação destas células. Por outro lado, a espessura desta camada é muito menor quando comparada à pele reconstituída na ausência de melanoma (Figuras 87, 88 e 89).

Figura 94: Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 sem tratamento. Imunofluorescência para laminina (verde) e filagrina (vermelho). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).

Figura 95: Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 sem tratamento. Controles negativos de imunofluorescência. Aumento de 200x.

Os controles negativos indicam somente uma marcação muito branda para a fluorescência verde, mostrando que estes experimentos têm pouca inespecificidade (Figura 95).

A pele reconstituída com células da linhagem Sk-Mel-28 mostrou morfologia similar na presença e na ausência do 2ME. Adicionando-se este composto nos últimos 5 dias de diferenciação da pele também é possível notar alterações na diferenciação da epiderme em relação à pele normal, onde a

camada córnea ainda é evidente, bem como focos de maior celularidade na derme (Figura 96).

Figura 96: Peles reconstituídas com células de melanoma da linhagem Sk-Mel-28 coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 100x (esquerda), 200x (centro) e 400x (direita).

Figura 97: Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 tratadas por 5 dias com 2ME. Imunofluorescência para involucrina (vermelho). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).

A marcação da involucrina, evidenciada em vermelho na figura 98, mostra, da mesma forma que na pele com melanoma sem tratamento, uma fluorescência mais branda que na pele normal. Esta marcação está limitada às camadas mais distantes da interface entre a derme e epiderme, mostrando as camadas mais diferenciadas deste tecido. Como no caso anterior, a citoqueratina 10 e citoqueratina 14 não foram detectadas, e a marcação com BrdU se mostrou inespecífica, com artefatos e precipitados, sendo impossível distinguir núcleos de células proliferativas.

A coloração específica para delimitar as células de melanoma mostra a maior quantidade de positividade restrita à epiderme. Alguns aglomerados celulares com marcação fluorescente verde podem ser observados na derme, mostrando que este melanoma continua atravessando a membrana basal e invadindo a matriz extracelular mesmo na presença do 2ME (Figura 98), apesar de ser inibido expressivamente em compacção com a pele não tratada.

Figura 98: Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 tratadas por 5 dias com 2ME. Imunofluorescência para o marcador de melanoma MelanA (verde). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).

Figura 99: Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 tratadas por 5 dias com 2ME. Imunofluorescência para laminina (verde) e filagrina (vermelho). Aumento de 100x (superior) e 200x (inferior).

Da mesma forma que as peles mostradas anteriormente, peles contendo melanoma que receberam tratamento com 2ME foram submetidas à imunofluorescência com anticorpos contra laminina, para evidenciar a membrana basal, e filagrina, para evidenciar as camadas mais diferenciadas do epitélio. Nota-se na figura 99 que a membrana basal, definida pela laminina em verde, limita a maior quantidade de células à epiderme, sendo que há poucos focos de invasão que atravessam esta barreira, adentrando a derme. A filagrina, que está presente nas camadas mais diferenciadas do epitélio, aparece em camadas muito próximas à membrana basal, marcando todas as células das camadas suprabasais do epitélio, mostrando desorganização do mesmo quando as células de melanoma estão presentes, mesmo após o tratamento com o 2ME.

Quando se comparam as peles reconstituídas na presença de melanoma que foram tratadas com 2ME com aquelas que não foram tratadas, fica evidente que este composto inibe as células tumorais. Esta inibição pode se dever à menor proliferação celular, bem como à inibição da capacidade invasiva destas células, que formam menor quantidade de focos de invasão na derme, como é observado na figura 101, que mostra lado a lado as peles com melanoma tratadas e as não tratadas com o 2ME.

Figura 100: Peles reconstituídas com células da linhagem Sk-Mel-28 tratadas por 5 dias com 2ME. Controles negativos de imunofluorescência. Aumento de 200x.

Mais uma vez, os controles negativos mostram uma marcação branda para a fluorescência verde, limitada à epiderme, indicando que estes experimentos possuem pouca marcação inespecífica (Figura 100).

Figura 101: Peles reconstituídas contendo células de melanoma Sk-Mel-28 na ausência de tratamento (coluna à esquerda) ou tratadas com 2ME por 5 dias (coluna à direita). Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) (linha superior), imunofluorescência para o marcador de melanoma MelanA em verde (linha central) e, contra laminina (verde) e filagrina (vermelho) (linha inferior). Núcleos celulares são evidenciados em azul por marcação com DAPI. Notar a diferença de celularidade na derme entre as peles tratadas e não tratadas, evidenciando a menor invasão e proliferação das células tumorais

DISCUSSÃO

Este trabalho descreve efeitos de dois compostos: o Resveratrol e o 2-metoxiestradiol, em linhagens tumorais de melanoma humano. O Resveratrol mostrou um certo efeito na morte celular, como observado por ensaios de azul de tripan e indução do processo autofágico, porém a investigação de seus efeitos foi descontinuada por serem necessárias doses altas para observar efeitos celulares. Assim, o trabalho foi focado nos efeitos do 2-metoxiestradiol, que já em doses baixas, mostrou alterações expressivas no comportamento das células aqui utilizadas.

Os efeitos principais do 2ME foram relativos principalmente à citotoxicidade e à proliferação celular. Foi importante para o trabalho mostrar que estes efeitos ocorreram em diferentes linhagens celulares, independentemente das alterações genéticas como mutação em BRAF, NRAS ou presença de p53, presentes nas células utilizadas, indicando que o composto é eficiente em melanoma mesmo considerando a sua heterogeneidade genética. Pela primeira vez também foi mostrado que este composto tem efeito citotóxico e anti-mitótico em linhagens celulares com a mutação BRAF V600E que são resistentes ao Vemurafenibe, ou duplo resistentes a Vemurafenibe + Trametinibe, indicando que o efeito deste composto ocorre de forma independente à resistência previamente adquiridas. Por outro lado, é necessário verificar se o mecanismo pelo qual a inibição de proliferação ocorre nestas células resistentes é similar ao que foi observado nas linhagens parentais

Trabalhos anteriores mostraram que o 2ME tem efeito anti-proliferativo em melanoma, porém vias moleculares não foram elucidadas. Dobos e colaboradores, em 2004, mostraram inibição de proliferação e indução de apoptose causados por 2ME em algumas linhagens celulares de melanoma (Dobos et al. 2004). Neste trabalho também mostraram que a polimerização da tubulina também é afetada pela presença deste composto, mas apesar de haver efeito anti-mitogénico, os mecanismos e padrões de regulação de proteínas envolvidas no ciclo celular nunca foram mostrados anteriormente.

Diferentes revisões sobre compostos que agem sobre microtúbulos (microtubules targeting agents – MTA) citam o 2ME como um agente anti-

câncer que atua pela interferência na polimerização da tubulina, por interagir com a subunidade da β -tubulina em sítio idêntico ao sítio de ação da colchicina (Mabjeesh et al. 2003, Jordan and Wilson 2004, Chua et al. 2010). De acordo com estes artigos, os MTAs constituem um grupo muito diverso de substâncias anti câncer, que foram usados com grande sucesso para o tratamento de múltiplos tipos tumorais (Jordan and Wilson 2004).

Embora tenha ação em células normais, existe a justificativa de que as células tumorais possuem alta taxa mitótica e proliferação muito mais alta que as células normais, e esta proliferação é descontrolada, portanto drogas dessa classe de substâncias que possuem efeito na inibição da formação de fibras do fuso durante a mitose, bem como na dinâmica de polimerização da tubulina, continuam sendo um grupo importante de quimioterápicos que devem continuar sendo estudados mais profundamente (Jordan and Wilson 2004, Mukhtar et al. 2014), apesar de possuírem, muitas vezes, alvos inespecíficos.

Neste trabalho, além do efeito do 2ME na polimerização da tubulina (Figuras 52 a 63), são mostrados outros efeitos que culminam na inibição de proliferação, como pode ser concluído pela contagem total de células (Figuras 20 e 21), pelas curvas de crescimento (Figura 35), e por ensaio colorimétrico de Alamar Blue (Figuras 48 a 50).

A indução de senescência foi observada em todas as linhagens celulares de melanoma utilizadas, mostrando fenótipo mais expressivo nas linhagens Sk-Mel-103 e Sk-Mel-147, onde a coloração azul da β -galactosidase associada à senescência mostrou-se mais intensa (Figura 58). Além disso, ensaios preliminares mostram que este fenótipo não é reversível mesmo após a retirada do 2ME das culturas celulares (Figura 61).

Além dos efeitos na indução senescência celular, esta inibição da proliferação resulta em um aumento da população de células na fase G2/M do ciclo celular (Figuras 51 a 54). Acompanhando a parada no ciclo celular observou-se modulação de proteínas que regulam esta fase do ciclo, mostrando pela primeira vez um possível mecanismo pelo qual o evento ocorre. Encontrou-se aumento da proteína $p21^{Cip1}$, que atua como inibidora de complexos ciclina-Cdk; inibição de pRb (phospo-S807S/S811), que encontra-se fosforilada em células proliferativas, porém, desfosforilada em células carenciadas que entram em G0; e inibição da Ciclina B1, que faz parte do

complexo ciclina-Cdk responsável pela regulação do ponto de checagem G2/M do ciclo celular (Figuras 55 e 56).

É importante ressaltar que a longo prazo, a exposição das células tumorais, mas não fibroblastos, ao 2ME, e a indução destes efeitos anti-proliferativos discutidos acima, resulta em uma dramática inibição da formação de colônias mesmo em concentrações baixas deste composto (Figuras 29 a 31). Pela primeira vez este drástico efeito foi observado em linhagens de melanoma com resistência previamente adquirida a outros compostos (Figura 32), mostrando que além da seletividade para células tumorais, o 2ME apresenta importante ação também em células quimiorresistentes. No entanto, o mecanismo molecular de ação do 2ME nas linhagens resistentes precisa ser confirmado para verificar se ocorre da mesma forma que nas linhagens não resistentes.

O mecanismo específico de inibição de proliferação com regulação de proteínas do ciclo celular pode variar conforme o modelo celular utilizado. Em glioblastomas, por exemplo, foi observado que o 2ME inibe o crescimento tumoral e a proliferação celular pela inibição do fator HIF1 α , e o composto só é capaz de inibir proliferação celular *in vitro* e o crescimento tumoral *in vivo* em células de glioblastoma que expressam PTEN (Muh et al. 2014). No modelo de melanoma, o 2ME foi efetivo na inibição de proliferação independentemente do status de PTEN, já que o mesmo foi testado em células que possuem (Sk-Mel-28) ou não (Sk-Mel-103) sua expressão.

Outros autores já haviam descrito o efeito do 2ME na indução de apoptose no modelo de melanoma (Ghosh et al. 2003, Dobos et al. 2004), como evidenciado aqui pela análise por citometria de fluxo (Figuras 51 a 53), e, de forma não mostrada anteriormente por western blotting, o mecanismo de indução desta via de morte celular programada, que mostra clivagem de caspases e de PARP (Figuras 42 a 45).

Os modelos tridimensionais mostraram resultados que vão de acordo com os obtidos em monocamada. Os ensaios realizados no modelo de esferóides mostraram um certo aumento na morte celular mostrada pela fluorescência vermelha, e uma expressiva inibição da invasão das células na matriz colagênica, principalmente nas linhagens Sk-Mel-147 e Sk-Mel-173 (Figuras 74 a 84). Mais uma vez, este efeito de maior indução de morte e de

inibição da invasão de células dos esferóides pela matriz extracelular foi observado em linhagens tumorais resistentes de forma similar à observada nas linhagens parentais, ressaltando o importante efeito anti-tumoral do 2ME. O tamanho menor dos esferóides após o tratamento com o 2ME pode também ser explicado pelo efeito antimitogênico deste composto, que mostrou inibição expressiva da proliferação nos experimentos em monocamada.

Por fim, as peles reconstituídas mostraram que o 2ME possui um efeito notável na inibição dos tumores também no modelo organotípico. Fica claro (Figura 101) que as peles tratadas com este composto possuem menor celularidade referente a focos de invasão tumoral na derme quando comparadas às peles não tratadas. É possível verificar, pela marcação para MelanA, a presença de células de melanoma na derme, e observa-se também, pela marcação contra laminina, que estas células atravessaram a membrana basal. Com o tratamento, estas ilhas de células de melanoma são menores, apesar de ainda presentes. Este efeito pode ser devido a inibição de proliferação e indução de morte celular observados em monocamada, bem como aos efeitos de inibição de invasão observado no modelo de esferóides, e mostram eficiência deste composto em um modelo que leva em consideração o microambiente tumoral em uma estrutura tridimensional próxima à observada no tecido humano.

Resumidamente (Figura 102), como amplamente demonstrado na literatura e demonstrado neste trabalho, o 2-metoxiestradiol age nas células de melanoma estabilizando a polimerização da tubulina. É descrito que a dinâmica de polimerização da tubulina é importante para a motilidade celular por regular a polimerização de actina e transporte de vesículas, bem como para a polarização da célula e direção do movimento (Ganguly et al. 2012). Desta forma, na célula que não está em divisão celular, o 2ME, pela capacidade de estabilizar os microtúbulos, inibe a invasão celular como observado nos ensaios de esferóides e pele reconstituída. Por outro lado, durante a divisão celular, a estabilização dos microtúbulos pode levar a uma desregulação da divisão dos cromossomos por influenciar na dinâmica de polimerização das fibras do fuso. Esta divisão aberrante pode culminar catástrofe mitótica (Castedo et al. 2004, Vitale et al. 2011), que é, segundo revisado por Vitale e colaboradores em uma tentativa unificadora de definição deste fenômeno, “um

mecanismo oncosupressor que evita a instabilidade genômica” (Vitale et al. 2011). A indução de catástrofe mitótica pode culminar na indução de diversos mecanismos, nos quais pode ocorrer paralelamente indução de fenótipos de morte celular por necrose, apoptose e até mesmo indução de senescência (Castedo et al. 2004, Portugal et al. 2010, Vitale et al. 2011).

Além dos efeitos na morte celular, o efeito causado pelo 2ME nos microtúbulos leva à uma expressiva inibição na proliferação, que é observada por um aumento de células na fase G2/M do ciclo celular, como constatado por citometria de fluxo, bem como uma notável indução de fenótipo senescente nas células tratadas com este composto. Por fim, as células tratadas podem dividir-se mesmo com a maior estabilidade dos microtúbulos, o que pode levar à uma divisão anormal com distribuição assimétrica dos cromossomos, levando à poliploidia. Eventualmente, em divisões subsequentes, a divisão desta célula poliplóide pode levá-la à morte ou à parada no ciclo celular, impedindo divisões subsequentes.

diferentes compostos, bem como expressão de vias de sinalização podem induzir parada do ciclo celular na fase G2/M seguido de senescência (Yun et al. 2009, Wang et al. 2013, Polewska et al. 2013, Krenning et al. 2014). Um exemplo de tratamento é com o agente que causa dano no DNA, Imidazoacrinidinona C-1311, que foi capaz de inibir proliferação de células humanas de câncer de pulmão na fase G2 do ciclo celular seguida de senescência com indução de p21 (Polewska et al. 2013). O silenciamento da expressão de ROC1 (Regulator of Cullins-1) também levou a inibição da proliferação de células de câncer de bexiga, e inibição do crescimento tumoral *in vivo* com parada na fase G2 do ciclo celular, indução de senescência e indução de p21 (Wang et al. 2013). Da mesma forma, a superexpressão de p31^{comet} foi capaz de inibir a proliferação de células de câncer de pulmão por indução senescência dependente do acúmulo de p21, indução de p53 e inibição de Ciclina B1 (Yun et al. 2009). Um elegante trabalho recente realizado com células imortalizadas mas não transformadas de epitélio pigmentado de retina mostrou que a ativação transiente de p53 na fase G2 do ciclo celular foi suficiente para levar a parada permanente do ciclo celular nesta fase e induzir senescência (Krenning et al. 2014). Neste trabalho a irradiação com raios γ em células na fase G2 do ciclo celular levou a um aumento de p53, acúmulo de p21 e degradação de Ciclina B1, e esta sequência de eventos levou a parada do ciclo celular na fase G2 e indução de senescência (Krenning et al. 2014).

Todos estes trabalhos mostram efeitos similares aos observados no melanoma após o tratamento com o 2ME: inibição de proliferação, parada do ciclo celular na fase G2/M, indução de senescência, acúmulo de p21 e inibição de Ciclina B1. Estas observações mostram que o efeito aqui observado está de acordo com o descrito na literatura, e que parte do mecanismo de ação do 2ME nos melanomas foi elucidado.

Por outro lado, o 2ME, quando administrado *in vivo*, possui disponibilidade biológica muito limitada e rápido metabolismo pelo fígado (Foster et al. 2008, Visagie et al. 2013). Por este motivo, recentemente, diversos compostos promissores análogos ao 2-metoxiestradiol foram desenvolvidos e têm sido testados para verificar suas atividades anti-tumorais (Chua et al. 2010, Theron et al. 2013, Visagie et al. 2013, Kambhampati et al.

2013, Visagie et al. 2014). Esses análogos mostraram maior biodisponibilidade e não são catabolizados pelo fígado assim que passam por ele (Stander et al. 2010), entretanto, a análise da atividade estrutural destes compostos mostrou que estes análogos possuem o mesmo mecanismo de ação do 2ME, agindo nos microtúbulos, inibindo a proliferação e induzindo apoptose (Stander et al. 2010).

Concluindo, neste trabalho foi mostrado pela primeira vez a forma pela qual o 2ME age na modulação de proteínas do ciclo celular induzindo a parada neste bem como a senescência celular, e que o seu mecanismo de ação vai de acordo com o que já foi descrito na literatura. Ainda mais importante, foi demonstrado que este mecanismo não se sobrepõe ao mecanismo de ação do Vemurafenibe, já que as células resistentes aqui utilizadas mostraram efeitos de inibição na formação de colônias e crescimento tridimensional similares às células parentais quando foram expostas ao 2ME. Isto prova que este composto é capaz de superar a resistência intrínseca dos melanomas bem como a adquirida de forma secundária, causando morte celular e inibição de proliferação nestas células. Apesar do seu uso não ter sido aprovado para melanomas pela FDA dos Estados Unidos por causa de sua baixa biodisponibilidade *in vivo*, é de suma importância compreender os mecanismos de ação do 2ME para melhoria de tratamento, teste de possíveis tratamentos combinatórios e desenvolvimento de novos análogos com maior eficiência. Em conjunto, estas abordagens podem contribuir a respostas clínicas mais eficientes que as disponíveis atualmente.

CONCLUSÃO

Os objetivos do trabalho foram atingidos com sucesso, mostrando o efeito dos compostos na citotoxicidade de linhagens de melanoma humano. Em função dos resultados obtidos com o composto Resveratrol (RES), foi decidido focar os esforços do trabalho no composto 2-metoxiestradiol (2ME), que mostrou efeitos citotóxicos e inibidores em concentrações mais baixas. Desta forma, este trabalho mostrou que:

- O 2ME levou à inibição de proliferação em células de melanoma humano com diferentes mutações, e esta inibição se mostrou seletiva para melanomas.
- O 2ME foi capaz de induzir morte celular por apoptose em uma fração das células, como observado por clivagem de caspases e marcação com anexina V.
- A indução de autofagia foi verificada, porém este processo não se mostrou de extrema importância na citotoxicidade das células.
- Foi observada pela primeira vez que a inibição do crescimento de melanomas causada pelo 2ME acontece também em linhagens BRAF V600E resistentes ao Vemurafenibe e duplo resistentes ao Vemurafenibe + Trametinibe.
- A inibição de proliferação está associada à parada das células na fase G2/M do ciclo celular e modulação de proteínas reguladoras como p21^{cip1}, Ciclina B1 e pRB.
- A indução do fenótipo de senescência também se mostrou muito expressivo após o tratamento com o 2ME, sendo um relevante mecanismo de inibição de proliferação.
- Ensaio com esferóides mostraram que o 2ME tem efeito similar em culturas tridimensionais, mostrando inibição de invasão e de viabilidade em células tratadas. Este efeito foi observado independentemente de quimiorresistência.

- O modelo de pele reconstituída mostrou que na ausência do tratamento focos de invasão de melanoma são observados na derme. Estes focos de invasão estão diminuídos quando a pele é tratada com 2ME.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aplin, A. E., Kaplan, F. M. and Shao, Y. 2011. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. *J Invest Dermatol*, 131(9), 1817-1820.
- Atefi, M., *et al.* 2014. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res*, 20(13), 3446-3457.
- Athar, M., *et al.* 2009. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 486(2), 95-102.
- Athar, M., *et al.* 2007. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol*, 224(3), 274-283.
- Baur, J. A. and Sinclair, D. A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 5(6), 493-506.
- Bhattacharya, S., Darjatmoko, S. R. and Polans, A. S. 2011. Resveratrol modulates the malignant properties of cutaneous melanoma through changes in the activation and attenuation of the antiapoptotic protooncogenic protein Akt/PKB. *Melanoma Res*, 21(3), 180-187.
- Brohem, C. A., *et al.* 2012. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. *Pigment Cell Melanoma Res*, 25(3), 354-369.
- Brose, M. S., *et al.* 2002. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*, 62(23), 6997-7000.
- Cartlidge, R. A., *et al.* 2008. Oncogenic BRAF(V600E) inhibits BIM expression to promote melanoma cell survival. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21(5), 534-544.
- Castedo, M., *et al.* 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23(16), 2825-2837.
- Chen, G., *et al.* 2005. Synthesis and anti-inflammatory activity of resveratrol analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 53(12), 1587-1590.
- Chen, Y., *et al.* 2008. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ*, 15(1), 171-182.
- Childs, B. G., *et al.* 2014. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep*.

- Childs, S. and Ling, V. 1994. The MDR superfamily of genes and its biological implications. *Important Adv Oncol*, 21-36.
- Chua, Y. S., Chua, Y. L. and Hagen, T. 2010. Structure activity analysis of 2-methoxyestradiol analogues reveals targeting of microtubules as the major mechanism of antiproliferative and proapoptotic activity. *Mol Cancer Ther*, 9(1), 224-235.
- D'Amato, R. J., *et al.* 1994. 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(9), 3964-3968.
- Dal-Pan, A., Blanc, S. and Aujard, F. 2010. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. *BMC Physiol*, 10, 11.
- Das Thakur, M., *et al.* 2013. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. *Nature*, 494(7436), 251-255.
- Datta, S. R., *et al.* 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2), 231-241.
- Davies, H., *et al.* 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954.
- Deichmann, M., *et al.* 2005. 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.
- Delmas, D., *et al.* 2006. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr Drug Targets*, 7(4), 423-442.
- Dobos, J., *et al.* 2004. In vitro and in vivo antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma. *Int J Cancer*, 112(5), 771-776.
- Fecher, L. A., *et al.* 2009. Drug targeting of oncogenic pathways in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 23(3), 599-618, x.
- Fernández, Y., *et al.* 2006. Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of bortezomib: impact on tumor cell death. *J Biol Chem*, 281(2), 1107-1118.
- Flach, E. H., *et al.* 2011. Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Mol Pharm*, 8(6), 2039-2049.

- Flaherty, K. T., *et al.* 2012. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*, 367(18), 1694-1703.
- Flaherty, K. T., *et al.* 2010. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(9), 809-819.
- Foster, P. A., *et al.* 2008. A new micronized formulation of 2-methoxyestradiol-bis-sulfamate (STX140) is therapeutically potent against breast cancer. *Anticancer Res*, 28(2A), 577-581.
- Fotsis, T., *et al.* 1994. The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature*, 368(6468), 237-239.
- Fukui, M. and Zhu, B. T. 2009. Mechanism of 2-methoxyestradiol-induced apoptosis and growth arrest in human breast cancer cells. *Mol Carcinog*, 48(1), 66-78.
- Ganguly, A., *et al.* 2012. The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *J Biol Chem*, 287(52), 43359-43369.
- Gao, N., *et al.* 2005. 2-Methoxyestradiol-induced apoptosis in human leukemia cells proceeds through a reactive oxygen species and Akt-dependent process. *Oncogene*, 24(23), 3797-3809.
- Garbe, C., *et al.* 2011. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist*, 16(1), 5-24.
- Gatouillat, G., *et al.* 2010. Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma. *J Cell Biochem*, 110(4), 893-902.
- Ghosh, R., *et al.* 2003. Cell cycle block and apoptosis induction in a human melanoma cell line following treatment with 2-methoxyoestradiol: therapeutic implications? *Melanoma Res*, 13(2), 119-127.
- Globocan, 2014. *Fact Sheets by Cancer* [online]. International Agency for Cancer Research. Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx [Accessed 08/10/2014 2014].
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. and Marais, R. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445(7130), 851-857.

- Grazia, G., *et al.* 2014. Towards combinatorial targeted therapy in melanoma: from pre-clinical evidence to clinical application (review). *Int J Oncol*, 45(3), 929-949.
- Greinert, R. 2009. Skin cancer: new markers for better prevention. *Pathobiology*, 76(2), 64-81.
- H., S. H., 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *In*: L., C. L. ed. American Journal of Enology and Viticulture, 49 - 52.
- Hamid, O., *et al.* 2013. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*, 369(2), 134-144.
- Hersey, P. and Zhang, X. D. 2001. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 1(2), 142-150.
- Hirschhaeuser, F., *et al.* 2010. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J Biotechnol*, 148(1), 3-15.
- Hodi, F. S., *et al.* 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8), 711-723.
- Holme, A. L. and Pervaiz, S. 2007. Resveratrol in cell fate decisions. *J Bioenerg Biomembr*, 39(1), 59-63.
- Howes, A. L., *et al.* 2007. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, PX-866, is a potent inhibitor of cancer cell motility and growth in three-dimensional cultures. *Mol Cancer Ther*, 6(9), 2505-2514.
- Howitz, K. T., *et al.* 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191-196.
- Hsieh, T. C., *et al.* 2005. Inhibition of melanoma cell proliferation by resveratrol is correlated with upregulation of quinone reductase 2 and p53. *Biochem Biophys Res Commun*, 334(1), 223-230.
- Hung, L. M., *et al.* 2000. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res*, 47(3), 549-555.
- Ibrahim, N. and Haluska, F. G. 2009. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol*, 4, 551-579.
- INCA, 2014. *INCA - Câncer - Tipo - Pele Melanoma* [online]. Available from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao [Accessed 08/10/2014 2014].
- Jang, M., *et al.* 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275(5297), 218-220.

- Janku, F., *et al.* 2011. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 8(9), 528-539.
- Jemal, A., *et al.* 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61(2), 69-90.
- Jessenberger, V. and Jentsch, S. 2002. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(2), 112-121.
- Ji, Z., Flaherty, K. T. and Tsao, H. 2010. Molecular therapeutic approaches to melanoma. *Mol Aspects Med*, 31(2), 194-204.
- Joe, A. K., *et al.* 2002. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 8(3), 893-903.
- Jordan, M. A. and Wilson, L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 4(4), 253-265.
- Kambhampati, S., *et al.* 2013. A second-generation 2-Methoxyestradiol prodrug is effective against Barrett's adenocarcinoma in a mouse xenograft model. *Mol Cancer Ther*, 12(3), 255-263.
- Kim, A. L., *et al.* 2006. Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways. *Exp Dermatol*, 15(7), 538-546.
- Kim, K. H., *et al.* 2011. Resveratrol targets transforming growth factor- β 2 signaling to block UV-induced tumor progression. *J Invest Dermatol*, 131(1), 195-202.
- Kirches, E. and Warich-Kirches, M. 2009. 2-methoxyestradiol as a potential cytostatic drug in gliomas? *Anticancer Agents Med Chem*, 9(1), 55-65.
- Kirkwood, J. M., *et al.* 2011. A phase 2 study of tasisulam sodium (LY573636 sodium) as second-line treatment for patients with unresectable or metastatic melanoma. *Cancer*, 117(20), 4732-4739.
- Kondo, Y., *et al.* 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer*, 5(9), 726-734.
- Krenning, L., *et al.* 2014. Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence. *Mol Cell*, 55(1), 59-72.
- Kwong, L. N. and Davies, M. A. 2014. Targeted therapy for melanoma: rational combinatorial approaches. *Oncogene*, 33(1), 1-9.

- La Porta, C. A. 2007. Drug resistance in melanoma: new perspectives. *Curr Med Chem*, 14(4), 387-391.
- Larkin, J., *et al.* 2014. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*.
- Larrosa, M., Tomás-Barberán, F. A. and Espín, J. C. 2003. Grape polyphenol resveratrol and the related molecule 4-hydroxystilbene induce growth inhibition, apoptosis, S-phase arrest, and upregulation of cyclins A, E, and B1 in human SK-Mel-28 melanoma cells. *J Agric Food Chem*, 51(16), 4576-4584.
- Lassen, A., *et al.* 2014. Effects of AKT inhibitor therapy in response and resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Mol Cancer*, 13, 83.
- Lazova, R., Klump, V. and Pawelek, J. 2010. Autophagy in cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol*, 37(2), 256-268.
- Levine, B. and Kroemer, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42.
- Li, J., *et al.* 2009. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Ann Surg Oncol*, 16(3), 761-771.
- Liang, Y. C., *et al.* 2003. Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol*, 65(7), 1053-1060.
- Lin, C. J., *et al.* 2012. Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. *Free Radic Biol Med*, 52(2), 377-391.
- Lin, W. M., *et al.* 2008. Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. *Cancer Res*, 68(3), 664-673.
- Long, G. V., *et al.* 2014. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N Engl J Med*.
- Lui, P., *et al.* 2007. Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer Treat Rev*, 33(8), 665-680.
- Luke, J. J. and Hodi, F. S. 2013. Ipilimumab, vemurafenib, dabrafenib, and trametinib: synergistic competitors in the clinical management of BRAF mutant malignant melanoma. *Oncologist*, 18(6), 717-725.
- Ma, X. H., *et al.* 2014. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest*, 124(3), 1406-1417.

- Mabjeesh, N. J., *et al.* 2003. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*, 3(4), 363-375.
- Mamalis, A., Garcha, M. and Jagdeo, J. 2014. Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. *Arch Dermatol Res*, 306(6), 511-519.
- Menea, F. 2013. Latest approved therapies for metastatic melanoma: what comes next? *J Skin Cancer*, 2013, 735282.
- Mizushima, N., *et al.* 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), 1069-1075.
- Muh, C. R., *et al.* 2014. PTEN status mediates 2ME2 anti-tumor efficacy in preclinical glioblastoma models: role of HIF1 α suppression. *J Neurooncol*, 116(1), 89-97.
- Mukhtar, E., Adhami, V. M. and Mukhtar, H. 2014. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol Cancer Ther*, 13(2), 275-284.
- Mullard, A. 2013. New checkpoint inhibitors ride the immunotherapy tsunami. *Nat Rev Drug Discov*, 12(7), 489-492.
- Narayanan, D. L., Saladi, R. N. and Fox, J. L. 2010. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*, 49(9), 978-986.
- Netscher, D. T., *et al.* 2011. Cutaneous malignancies: melanoma and nonmelanoma types. *Plast Reconstr Surg*, 127(3), 37e-56e.
- Nikolaou, V. A., *et al.* 2012. Melanoma: new insights and new therapies. *J Invest Dermatol*, 132(3 Pt 2), 854-863.
- Niles, R. M., *et al.* 2003. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett*, 190(2), 157-163.
- Paglin, S., *et al.* 2001. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*, 61(2), 439-444.
- Palsamy, P. and Subramanian, S. 2008. Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomed Pharmacother*, 62(9), 598-605.
- Park, J. W., *et al.* 2001. Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity. *Carcinogenesis*, 22(10), 1633-1639.

- Parks, M., *et al.* 2011. 2-Methoxyestradiol: new perspectives in colon carcinoma treatment. *Mol Cell Endocrinol*, 331(1), 119-128.
- Polewska, J., *et al.* 2013. DNA-damaging imidazoacridinone C-1311 induces autophagy followed by irreversible growth arrest and senescence in human lung cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 346(3), 393-405.
- Portugal, J., Mansilla, S. and Bataller, M. 2010. Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. *Curr Pharm Des*, 16(1), 69-78.
- Puzanov, I. and Flaherty, K. T. 2010. Targeted molecular therapy in melanoma. *Semin Cutan Med Surg*, 29(3), 196-201.
- Qanungo, S., *et al.* 2002. 2-Methoxyestradiol induces mitochondria dependent apoptotic signaling in pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 21(26), 4149-4157.
- Rebecca, V. W., *et al.* 2014. Inhibition of autophagy enhances the effects of the AKT inhibitor MK-2206 when combined with paclitaxel and carboplatin in BRAF wild-type melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27(3), 465-478.
- Ren, S. and Rollins, B. J. 2004. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. *Cell*, 117(2), 239-251.
- Roberti, A., *et al.* 2011. Ubiquitin-mediated protein degradation and methylation-induced gene silencing cooperate in the inactivation of the INK4/ARF locus in Burkitt lymphoma cell lines. *Cell Cycle*, 10(1), 127-134.
- Rubinsztein, D. C., *et al.* 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*, 6(4), 304-312.
- Russo, A. E., *et al.* 2009. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *Int J Oncol*, 34(6), 1481-1489.
- Shankar, S., Singh, G. and Srivastava, R. K. 2007. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci*, 12, 4839-4854.
- Siegel, R., *et al.* 2014. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 64(1), 9-29.
- Smalley, K. S. 2010. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *J Invest Dermatol*, 130(1), 28-37.

- Smalley, K. S., Nathanson, K. L. and Flaherty, K. T. 2009. Genetic subgrouping of melanoma reveals new opportunities for targeted therapy. *Cancer Res*, 69(8), 3241-3244.
- Smalley, K. S. and Sondak, V. K. 2010. Melanoma--an unlikely poster child for personalized cancer therapy. *N Engl J Med*, 363(9), 876-878.
- Smoliga, J. M., Baur, J. A. and Hausenblas, H. A. 2011. Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res*, 55(8), 1129-1141.
- Soengas, M. S. and Lowe, S. W. 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 22(20), 3138-3151.
- Sondak, V. K., *et al.* 2011. Ipilimumab. *Nat Rev Drug Discov*, 10(6), 411-412.
- Stahl, J. M., *et al.* 2004. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res*, 64(19), 7002-7010.
- Stander, B. A., *et al.* 2010. In vitro effects of 2-methoxyestradiol on morphology, cell cycle progression, cell death and gene expression changes in the tumorigenic MCF-7 breast epithelial cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 119(3-5), 149-160.
- Sznol, M. 2014. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway as a basis for combination anticancer therapy. *Cancer J*, 20(4), 290-295.
- Takaoka, M., 1940. Phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandifolium* Loes. fil.). II. Synthesis of Resveratrol and its derivatives. *Proc Imperial Acad*, 405-407.
- Theron, A. E., *et al.* 2013. Molecular crosstalk between apoptosis and autophagy induced by a novel 2-methoxyestradiol analogue in cervical adenocarcinoma cells. *Cancer Cell Int*, 13(1), 87.
- Tormo, D., *et al.* 2009. Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell*, 16(2), 103-114.
- Vang, O., *et al.* 2011. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One*, 6(6), e19881.
- Verhaegen, M., *et al.* 2006. A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species. *Cancer Res*, 66(23), 11348-11359.

- Visagie, M., *et al.* 2013. Sulphamoylated 2-methoxyestradiol analogues induce apoptosis in adenocarcinoma cell lines. *PLoS One*, 8(9), e71935.
- Visagie, M. H., Birkholtz, L. M. and Joubert, A. M. 2014. 17-beta-estradiol analog inhibits cell proliferation by induction of apoptosis in breast cell lines. *Microsc Res Tech*, 77(3), 236-242.
- Vitale, I., *et al.* 2011. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(6), 385-392.
- Wan, P. T., *et al.* 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*, 116(6), 855-867.
- Wang, Q., *et al.* 2002. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res*, 958(2), 439-447.
- Wang, W., *et al.* 2013. Knockdown of regulator of cullins-1 (ROC1) expression induces bladder cancer cell cycle arrest at the G2 phase and senescence. *PLoS One*, 8(5), e62734.
- Wolchok, J. D., *et al.* 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*, 369(2), 122-133.
- Wood, J. G., *et al.* 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430(7000), 686-689.
- Yap, T. A., Omlin, A. and de Bono, J. S. 2013. Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways. *J Clin Oncol*, 31(12), 1592-1605.
- Yun, M., *et al.* 2009. p31comet Induces cellular senescence through p21 accumulation and Mad2 disruption. *Mol Cancer Res*, 7(3), 371-382.

ANEXO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DA USP (CEP-HU/USP)
APRESENTAÇÃO DE EMENDAS E EXTENSÕES

Registro CEP-HU/USP: 943/09

Registro SISNEP-CAAE: 0062.0.198.000-09

Pesquisador(a) responsável: Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler

Título do Projeto de Pesquisa:

Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos

Descrição da Emenda ou Extensão

(EMENDA: é qualquer proposta de modificação no projeto original, apresentada com a justificativa que a motivou; EXTENSÃO: é a proposta de prorrogação ou continuidade da pesquisa com os mesmos sujeitos recrutados, sem mudança essencial nos objetivos e na metodologia do projeto original. Havendo modificações importantes de objetivos e métodos, deverá ser apresentado outro protocolo de pesquisa.)

Inclusão dos Pós-graduandos Paula Comune Pennacchi, Paula Anastácia Ferreira, Fernanda Branco Filippin, Guilherme Galvão dos Santos e Renato Ramos Massaro como membros da equipe.

Data: 03 de Novembro de 2010.

Local: São Paulo

Nome Legível do Pesquisador Responsável: Silvy Stuchi Maria Engler

Assinatura do Pesquisador Responsável

OBSERVAÇÃO: NÃO PREENCHER ESTE FORMULÁRIO A MÃO

Página 1 de 1

ANEXO VII

TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR

REFERENTE: Projeto de Pesquisa "Geração de peles artificiais humanas e melanomas invasivos como plataforma para testes farmacológicos"

Ao
Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da Universidade de São Paulo

Eu, Renato Ramos Massaro CPF nº 315396978-78, declaro que participarei da equipe de trabalho do Projeto de Pesquisa acima mencionado, sob responsabilidade do Pesquisador Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler.

Confirmando ter conhecimento do conteúdo do Protocolo de Pesquisa e estou ciente e assumo o compromisso de cumprir os termos da Resolução CNS nº 196/96 e suas resoluções complementares.

São Paulo, 03 de Novembro de 2010.

Nome: Renato Ramos Massaro

Assinatura: Renato R. Massaro