UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Avaliação da atividade citotóxica e melanogênica do complexo de platina (II) com derivado de hidantoína em melanoma

Fernanda Branco Filippin

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

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

F483a Filippin, Fernanda Branco
Avaliação da atividade citotóxica e melanogênica do complexo de platina (II) com derivado de hidantoína em melanoma / Fernanda Branco Filippin. -- São Paulo, 2013.
68p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi

1. Pele : Câncer 2. Compostos de platina : Quimioterapia
I. T. II. Maria-Engler, Silvy Stuchi, orientador.

616.9945 CDD

Fernanda Branco Filippin

Avaliação da atividade citotóxica e melanogênica do complexo de platina (II) com derivado de hidantoína em melanoma

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Silvy Stuchi Maria-Engler

Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, este exemplo de mulher, pela paciência e tranquilidade e por sempre ter acreditado em mim, muitas vezes mais do que eu mesma.

Ao meu pai, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pelas gargalhadas intermináveis que me fazem esquecer de tudo nos momentos difíceis e principalmente: Pelo modelo exemplar de profissional farmacêutico que seguirei pelo resto da vida!

Aos meus irmãos agradeço por todo o auxílio nos momentos difíceis, por estarem sempre disponíveis e ao meu lado, mas agradeço principalmente por serem meus irmãos. Agradeço especialmente a minha irmã Fabíola, por me incentivar na pesquisa.

Ao laboratório de Bioquímica da professora Ana Campa, obrigada pela amizade, empréstimo de material e ajuda.

Ao professor Ivan Pitta, da Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos – LPSF pela colaboração nos doando o composto desenvolvido CX42, bem como o controle NN10.

Agradeço a minha grande amiga e colega, Andréa Fruet, pelas discussões intermináveis sobre melanogênese e pela ajuda na bancada.

Aos meus amigos, pelos inesquecíveis momentos de descontração, conselhos e principalmente pelo apoio em todos os momentos. Agradeço a Deus por ter vocês em minha vida, vocês são a família que pude escolher.

Ao Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas. Agradeço a todos funcionários pela ajuda.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização do mestrado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado e pela suporte financeiro. À CAPES e CNPq, pelo suporte financeiro à pesquisa.

À Deus pela minha vida, e pela oportunidade de a cada dia, poder torná-la melhor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão esquemática da via de sinalização mediada por MC1. (Adaptado de SHIAFFINO, 2010).	14
Figura 2: Esquema de biossíntese da eu melanina e feomelanina. (Adaptado de HEARING, 2011).	17
Figura 3: Principais vias de sinalização no melanócito e no melanoma. Adaptado de FLAHERTY et al., 2012.	18
Figura 4: Modelo esquemático de resistência a fármacos mediado pelos melanossomos. Os melanossomas apresentam quatro estágios de maturação até a formação da melanina(I- VI). O modelo celular é baseado na biogênese do melanossomo, relacionando as fases de maturação do mesmo com a sensibilidade aos fármacos. Os melanossomos nos estágios iniciais (I-II) e finais. Adaptado de CHEN et al., 2009).	20
Figura 5: Estrutura química dos compostos: CX42, NN10 e CIS.....	24
Figura 6: Efeito citotóxico do CX42 na linhagem Sk Mel 103 por 24, 48 e 72h. Os valores foram expressos em média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=3 em octuplicata).	30
Figura 7: Efeito Citostático dos compostos nas células estudadas. Tempo de incubação 24h. Os valores foram expressos em média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=3 em triplicata).Two-way ANOVA foi realizado).	32
Figura 8: Efeito citostático dos compostos nas células estudadas. Tempo de incubação 48h. Os valores foram expressos em média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=3 em triplicata).Two-way ANOVA foi realizado).	33
Figura 9: Fotomicrografia das células com tratamento com os diferentes compostos. Tempo de incubação de 24h, com os compostos na concentração de 50 μ M. As imagens foram obtidas no aumento de 40X em	

microscópio ótico. As alterações na morfologia celular são consequência da exposição aos compostos estudados..... 34

Figura 10: Ensaio clonogênico. Crescimento de colônias das células estudadas após tratamento de 14 dias com os compostos na concentração de 10 μ M. 36

Figura 11: Diferentes fases do ciclo celular de células B16F10 tratadas com CX42 e NN10 na concentração de 50 μ M. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h e 48h de tratamento com os compostos. B.Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M , branco. Três experimentos independentes em duplicata (n=9) (**p<0,001 em relação ao controle. Two-way ANOVA foi realizado)..... 38

Figura 12: Diferentes fases do ciclo celular de células Sk Mel28 tratadas com Cx42 e NN10 na concentração de 50 μ M. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h e 48h de tratamento com os compostos. B.Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M , branco. Três experimentos independentes em duplicata (n=9) (**p<0,001 em relação ao controle. Two-way ANOVA foi realizado)..... 38

Figura 13: Diferentes fases do ciclo celular de células Sk Mel103 tratadas com CX42 e NN10 na concentração de 50 μ M. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h e 48h de tratamento com os compostos. B.Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M , branco.. Três experimentos independentes em duplicata (n=9) (**p<0,001 em relação ao controle. Two-way ANOVA foi realizado)..... 39

Figura 14: Diferentes fases do ciclo celular de células HaCat tratadas com CX42 e NN10 na concentração de 50 μ M. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h tratamento com os compostos. B.Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M ,

branco. Três experimentos independentes em duplicata (n=9) (**p<0,001 em relação ao controle. Two-way ANOVA foi realizado)..... 40

Figura 15: Diferentes fases do ciclo celular de células de fibroblasto tratadas com CX42 e NN10 na concentração de 50µM. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h e 48h de tratamento com os compostos. B.Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M , branco.. Três experimentos independentes em duplicata (n=9)..... 40

Figura 16: Fotografia dos *pellets* celulares da linhagem B16F10 durante o procedimento do ensaio de exclusão por azul de tripan com tratamento do CX 42 por 48h..... 41

Figura 17: Efeito dos compostos sobre a atividade da tirosinase na linhagem B16F10. A atividade da tirosinase foi expressa em porcentagem em relação ao controle não tratado (0). Os valores foram expressos em média ± SD de 2 experimentos independentes (n=2 em duplicata). (**p<0,001versus controle. One-way ANOVA foi realizado). 42

Figura 18: Fotografia dos *pellets* celulares da linhagem B16f10 com tratamento com os compostos por 48h na realização do ensaio da tirosinase. 42

Figura 19 Fotomicrografia para determinação da senescência. A linhagem estudada foi submetidas a reação com X-Gal, que gera marcação azulada em células senescentes. Como controle positivo da reação foi utilizado a doxorrubicina na concentração de 5µg/Ml..... 43

Figura 20 Determinação da morte celular por citometria de fluxo em células B16F10. As células foram tratadas com os compostos por 24h e analisadas.A. Histogramas representam as melhores leituras. B. Valores expressos em percentual de células viáveis (AFITC/PI negativo, cinza), células em apoptose (AFITC positivo, preto), células em necrose (PI positivo) e células em apoptose e necrose (AFITC/ PI positivo, em branco com listras).Foram realizados 3 experimentos independentes, n=9).C. Fotomicrografia dos tratamentos. 44

Figura 21 Determinação da morte celular por citometria de fluxo em células B16F10. As células foram tratadas previamente com IBMX para estimular a melanogênese e posteriormente com os compostos por 24h e analisadas. **A.** Histogramas representam as melhores leituras. **B.** Valores expressos em percentual de células viáveis (AFITC/PI negativo, cinza), células em apoptose (AFITC positivo, preto), células em necrose (PI positivo) e células em apoptose e necrose (AFITC/ PI positivo, em branco com listras). Foram realizados 3 experimentos independentes, n=9), (***) $p < 0,001$ em relação ao controle). **C.** Fotomicrografia dos tratamentos. 44

Figura 22: Gráfico de correlação entre apoptose e Atividade da tirosinase, ambos expressos em porcentagem..... 45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	Melanoma, melanogênese e quimioresistência.....	11
2.1.1	Melanogênese	11
2.1.2	Melanoma	17
2.1.3	Melanoma e melanogênese	19
2.2	Compostos estudados	21
3	OBJETIVO GERAL.....	22
3.1	Objetivos específicos.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Linhagens celulares e culturas primárias	23
4.2	Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.....	24
4.3	Complexo de platina (II) com derivado de hidantoína (CX42)	24
4.4	MTT (brometo de (3- (4,5- dimetiltiazol – 2il) – 2,5 difeniltetrazólio))	24
4.5	Exclusão por Azul de Tripan	25
4.6	Ensaio Clonogênico	25
4.7	Atividade de tirosinase	26
4.8	Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	26
4.9	Necrose e Apoptose.....	27
4.10	Senescência.....	27
4.11	Análise Estatística.....	28
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Viabilidade celular	29

5.1.1 CX42 diminui a viabilidade das células de melanoma por MTT.....	29
5.1.2 Atividade citostática do composto CX42 em células de melanoma	31
5.1.3 Diminuição da formação de colônias após tratamento com o composto CX42 nas células de melanoma	35
5.2 Ciclo Celular.....	37
5.3 Avaliação da atividade Melanogênica.....	41
5.3.1 Atividade da tirosinase	Error! Bookmark not defined.
5.4.Senescência.....	42
5.5 Identificação do tipo de morte celular induzida (apoptose, necrose) pela ação do CX42 na linhagem murina B16F10.....	43
5.5.1 Avaliação do tipo de morte celular (apoptose/necrose)	43
5.5.2 Dados de correlação: Apoptose x Atividade da Tirosinase.....	45
6 DISCUSSÃO	46
REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS	56

RESUMO

FILIPPIN, F.B. Avaliação da atividade citotóxica e melanogênica do complexo de platina (II) com derivado de hidantoína em melanoma. 2013. 68f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Considerando o melanoma a forma mais agressivas de câncer de pele e mais resistente aos tratamentos convencionais, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade de um novo complexo de platina (II) com derivado de hidantoína (CX42) em células de melanoma humano e murino. Foram utilizados também para comparação células da pele (fibroblastos, queratinócitos e melanócitos) e os compostos cisplatina (CIS) e complexo de hidantoína isolado (NN10). Ensaio de viabilidade, ciclo e morte celular foram realizados. Investigou-se também a atividade da enzima tirosinase, principal enzima que regula a síntese de melanina durante o processo conhecido como melanogênese. Como resultados, obteve-se a diminuição da viabilidade celular e parada de ciclo na fase G0/G1 nas células de melanoma, principalmente na linhagem murina B16F10, frente ao composto CX42. Em células B16F10, foi possível observar estímulo na melanogênese, com aumento da atividade da enzima tirosinase. O CX42 apresentou uma atividade com efeito citostático nas células de melanoma, não sendo observado efeito citotóxico nas células da pele. Ainda, com a prévia estimulação da melanogênese, o CX42 apresentou-se mais efetivo, aumentando a morte celular em 40% por apoptose. Portanto, conclui-se que o CX42 diminuiu a viabilidade celular e seu efeito foi mais intenso quando as células apresentavam-se pigmentadas, demonstrando indução da tirosinase e da morte celular, atributo importante para potenciais novos fármacos anti-melanoma.

Palavras-chave: Melanoma, tirosinase, melanogênese, complexo de platina (II) com derivado de hidantoína.

ABSTRACT

FILIPPIN, F.B. Evaluation of cytotoxic and melanogenic activity of the complex of platinum (II) with hydantoin derivative in melanoma. 2013. 68f. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Since melanoma is one of the most aggressive forms of skin cancer and more resistant to conventional treatments, the present study aimed to evaluate the activity of a new platinum complex (II) with hydantoin derivative (CX42) in melanoma cells human and murine. Skin cells (fibroblasts, keratinocytes and melanocytes) were used as control and the compounds cisplatin (CIS) and hydantoin compound alone (NN10) were also evaluated. Viability assays, cell cycle analysis and cell death characterization were performed. Likewise, the activity of tyrosinase, the key enzyme that regulates melanin synthesis during the process known as melanogenesis, was also investigated. The results demonstrated a reduction in cell viability and cell cycle arrest in G0/G1 phase of murine melanoma B16F10 treated with CX42. In B16F10 cells, it was also observed melanogenesis stimulation with increased activity of tyrosinase. The CX42 showed a selective cytostatic effect on melanoma cells, however no toxic effects were observed in skin cells. In addition, with prior stimulation of melanogenesis, the CX42 demonstrated to be more effective, increasing apoptosis cell death in 40%. Therefore, the results demonstrated that CX42 decreased cell viability and the intensity of its effect is associated with cell pigmentation, demonstrating an association between tyrosinase high activity and induction of cell death which is an important attribute for new potential anti-tumoral drugs.

Keywords: Melanoma, tyrosinase, melanogenesis, complex of platinum (II) with hydantoin derivative.

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é a forma de câncer de pele mais agressiva e corresponde a 4% do total de cânceres de pele e 75% das causas de morte, portanto é reconhecido que o melanoma apresenta baixa incidência, porém alta letalidade. (NCI, 2013).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), do Ministério da Saúde, para 2012 foram estimados 6.230 novos casos de melanoma cutâneo no Brasil, sendo 3.170 em homens e 3.060 em mulheres. O número de mortes registrado em 2008 foi de 1.311, sendo 754 homens e 557 mulheres (BRASIL, 2012).

São conhecidos alguns fatores de risco para o aparecimento do melanoma como o tipo de pele e o número de nevus (pintas) (GREINERT, 2009). Indivíduos com antecedentes familiares com casos de melanoma possuem um risco de desenvolver a doença de 30 a 70 vezes maior do que o restante da população (IBRAHIM; HALUSKA, 2009).

O melanoma se forma a partir da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina que se originam embriologicamente da crista neural, sendo a pele seu principal sítio primário. Seu desenvolvimento é resultante de múltiplas e progressivas mutações no DNA (ácido desoxirribonucléico) celular. Consequentemente, esses melanócitos malignos podem proliferar e se disseminar (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

O tratamento varia de acordo com o estágio da doença. Para os melanomas diagnosticados precocemente, a cirurgia é o tratamento de escolha e pode eficaz se a lesão for totalmente removida. Contudo, para fases mais adiantadas da doença, na fase metastática, os pacientes vão a óbito em 6 a 8 meses após o diagnóstico. Isso ocorre devido a resistência à terapêutica convencional e ao alto poder metastático do melanoma (FLAHERTY; HODI; FISHER, 2012).

A causa precisa da resistência terapêutica no melanoma ainda é desconhecida e alguns mecanismos são propostos, dependendo do fármaco

utilizado, dentre eles: mecanismo de resistência a múltiplas drogas (MDR), superexpressão de inibidores de apoptose, expressão alterada de genes, indução de vias de sobrevivência da célula e, mais recentemente inclui-se a detoxificação de fármacos pelos melanossomos (organelas responsáveis pela produção de melanina) em um processo dependente de formação de autofagossomo (CHEN et al., 2009).

Diante dessa resistência reconhecida, existem avanços na terapia alvo-específicas para o câncer, e uma delas é a exploração das propriedades biológicas das células cancerosas. A propriedade exclusiva dos melanócitos e das células de melanoma consiste na capacidade de produzir o pigmento melanina (DAKOUR et al., 1993). Sabe-se que alguns quimioterápicos citostáticos utilizados no tratamento do melanoma maligno possuem a capacidade de modular a atividade da tirosinase (XIE et al., 2009).

Nesse contexto, no presente estudo foi utilizado um complexo de platina com derivado de hidantoína como a molécula capaz de interferir na melanogênese e na viabilidade celular. Os derivados de hidantoínas já foram identificados por terem demonstrado efeitos na atividade da enzima tirosinase. Segundo Ha e colaboradores (2011), alguns derivados de hidantoínas foram analisados com relação à inibição da enzima tirosinase e formação de melanina. Por outro lado o uso contínuo da fenitoína (difetil-hidantoína), um anticonvulsivante amplamente utilizado, tem sido associado com o aparecimento de manchas na pele (melasma) resultante da presença de melanócitos hiperfuncionais (NAMAZI, 2005).

Considerando que a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e estabelecimento do melanoma é essencial para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas, o presente estudo teve como objetivo compreender os mecanismos moleculares da ação de um novo complexo de platina (II) com derivado de hidantoína, o CX42, em células de melanoma, avaliando seu efeito antitumoral em modelos de monocamada, sua seletividade e modulação da via melanogênica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Melanoma, melanogênese e quimioresistência

A pele é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Essas camadas promovem uma barreira mecânica do organismo com o meio ambiente e também exercem uma importante atividade imune defendendo o organismo contra influências exógenas como radiação ultravioleta (UV), reagentes tóxicos, infecções e estresse mecânico (FUCHS; RAGHAVAN, 2002).

A derme e a epiderme estão interconectadas por papilas dérmicas e epidérmicas e são separadas pela barreira dermoepidérmica. A epiderme, que forma a barreira externa entre organismos e o ambiente, apresenta várias camadas constituídas por diferentes tipos celulares com variadas funções. (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004).

Dentre essas células da epiderme, os queratinócitos são as células prevalentes e estão presentes em todas as camadas da mesma. Além dos queratinócitos, estão também presentes os melanócitos, células de Merkel e de Langerhans (SCHERER; KUMAR, 2010). A derme consiste primariamente por tecido conjuntivo denso, matriz de colágeno e fibras de elastina. Os fibroblastos são as células predominantes dessa camada, além de outras células como mastócitos, macrófagos e adipócitos (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004).

2.1.1 Melanogênese

Os melanócitos são células dendríticas originárias da crista neural, que migram durante o desenvolvimento embrionário para a epiderme. São responsáveis pela produção de melanina (COSTIN; HEARING, 2007) e exibem a capacidade de responder a estímulos parácrinos, endócrinos ou por meio externo, como a radiação ultravioleta (UV) (LIN; FISHER, 2007).

Os queratinócitos, em resposta a radiação UV, secretam fatores, citados mais adiante, que estimulam os melanossomos, organelas exclusivas dos melanócitos, a produzirem melanina, por meio de um processo de pigmentação da pele chamado melanogênese. A pigmentação endógena, ou seja, basal dos

melanócitos é majoritariamente determinada geneticamente (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

A radiação UV possui comprimento de onda de 100 a 400 nm, é dividida em UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm), sendo a última barrada pela camada de ozônio. A radiação UVB é diretamente absorvida pelo DNA celular dos queratinócitos, processo que leva à formação de fotoprodutos de DNA, principalmente dímeros de timina e pirimidina. Nesta reação, dinucleotídeos de timidina ativam a proteína 53 (p53), que estimula o aumento de mRNA do gene da enzima tirosinase e do gene promotor do peptídeo pró-ópio-melanocortina (POMC), estabelecendo um sinal contínuo para a melanogênese, gerando uma coloração adaptativa (PARK et al., 2009).

O peptídeo POMC é sintetizado em várias regiões do cérebro, tecidos periféricos e órgãos, incluindo a pele. Origina vários peptídeos bioativos representantes da família das melanocortinas, tais como α -hormônio estimulante de melanócito (α -MSH), β -MSH e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (ABDEL-MALEK; KADEKARO; SWOPE, 2010). O hormônio α -MSH se liga ao receptor de melanocortina-1 (MC1R) nos melanócitos resultando num aumento da produção de eumelanina (pigmento escuro) (PARK et al., 2009).

O receptor MCR1 está presente na membrana plasmática dos melanócitos e é ativado pelo hormônio α -MSH. Porém, pode ser inativado pela proteína Agouti. Para esta proteína ser totalmente eficaz, necessita-se de um coreceptor, a atractina, que auxilia a ligação da proteína Agouti ao receptor MCR1. Para a sinalização se completar, a proteína Agouti depende da proteína Mahogunin, presente no citosol, que compete com a proteína G_s pela ligação com o receptor MCR1. Além disso, o MCR1 possui um agonista neutro, a β -defensina, que interage tanto com a ligação do agonista como com o antagonista, reforçando o grau de atividade constitutiva do receptor (SHIAFFINO, 2010).

A via canônica de ativação do MCR1 leva a um aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c), via proteína G_s e adenilato ciclase, que prossegue no núcleo com a transcrição de CREB via fosforilação da proteína quinase A (PKA) com a consequente ativação de MITF. O aumento da atividade de MITF

é reforçado pela regulação da ativação de ERK, provavelmente como fato resultante da comunicação entre a via do receptor acoplado a proteína G (MCR1) e do receptor tipo tirosina quinase (c-Kit) (BUSCA; BALLOTTI, 2000; SHIAFFINO, 2010).

O MITF pertence a uma família de fatores de transcrição, e é crucial na regulação de proliferação e síntese da melanina nos melanócitos. O MITF se liga a promotores e estimula a transcrição gênica, codificando proteínas melanossomais (Tirosinase, TYRP1 e TYRP2 – proteína relacionada a tirosinase 1 e 2, PMEL17, OAC1, Rab27a, etc). (BERTOLOTTI et al., 1998; SOLANO et al., 2006; LEE et al., 2007). Esses eventos podem ser visualizados na figura 1.

Figura 1: Visão esquemática da via de sinalização mediada por MC1.
(Adaptado de SHIAFFINO, 2010).

Após a transcrição das proteínas melanossomais, os melanosomas apresentam estágios de maturação, como descrito a seguir (MARKS; SEABRA, 2001). No estágio I, as vesículas esféricas dos melanosomas são desprovidas de melanina e possuem uma matriz desorganizada. No estágio II, os melanosomas se tornam alongados, com estrias internas bem definidas. A deposição de melanina começa no estágio III, se acumulando nas estruturas

transversais, resultando em um espessamento e escurecimento das estrias. O estágio IV é reconhecido quando o melanossomo está totalmente preenchido por melanina (WEI, 2006).

A proteína *silver locus* (Pmel17 ou gp100) é encaminhada inicialmente para os melanossomas do estágio I onde vai ser parcialmente clivada devido à natureza altamente proteolítica das enzimas presentes no meio. Sua quebra e processamento acompanham a reestruturação dos melanossomos iniciais de vesículas arredondadas com componentes amorfos (estágio I) para estruturas fibrilares alongadas (estágio II) (KUSHIMOTO et al., 2001).

Somente quando os melanossomos passam para o estágio II é que as enzimas tornam-se resistentes à proteólise e a produção da melanina prossegue. A melanogênese propriamente dita começa quando a tirosinase e outras enzimas importantes são clivadas, sendo dependentes de um meio ácido provido por bombas de prótons (estágio III e IV). Com a produção de melanina, gera-se uma citotoxicidade endógena melanogênica, com substâncias que são externalizadas pela formação de autofagossomos (HEARING; PHILLIPS; LUZTNER, 1973).

Os autofagossomos são vesículas com dupla membrana, que se fundem aos lisossomos, onde o conteúdo desse autofagossomo é degradado. Esse processo é conhecido por autofagia e funciona como um mecanismo de proteção para a célula, favorecendo a adaptação ao stress e evitando a morte celular. Porém em condições específicas, pode constituir uma via alternativa de morte celular (MAIURI et al., 2010).

A melanina ocorre em duas formas, eumelanina, um polímero insolúvel de coloração preta escura, e feomelanina, um polímero de enxofre de coloração vermelho-amarelo. Ambos são derivados de 3,4-di-hidroxi-fenilalanina (DOPA). A enzima tirosinase catalisa a oxidação da tirosina para dopaquinona, um precursor da L-DOPA. O subsequente metabolismo de DOPA e seus derivados até a formação da melanina propriamente dita é desencadeado por várias enzimas melanocíticas como as proteínas relacionadas a tirosinase (TYRP1 e TYRP2) (YAMAGUCHI; BRENNER; HEARING, 2007).

A melanina protege a pele e os olhos da radiação UV (SLOMINSKI et al., 2004) o ouvido de ruídos traumáticos (TACHIBANA, 1999) e as células neurais da toxicidade de metais pesados (NICOLAUS, 2005).

A deficiência na melanogênese possui um impacto fisiológico em vários órgãos e contribui para a etiologia de distúrbios pigmentares adquiridos como vitiligo e melasma (EL. MOFTY; ESMAT; ALDEL-HALIM, 2007).

Com relação a biossíntese da melanina, a tirosinase, enzima chave para esse processo, requer o íon cobre como cofator catalisando duas etapas da síntese de melanina. A primeira delas é a hidroxilação da tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) ou diretamente a o-dopaquinona pela tirosinase. A o-dopaquinona é convertida a L-DOPA e a dopacromo através de auto-oxidação em pH fisiológico. A L-DOPA também é substrato da tirosinase, sendo oxidada enzimaticamente a o-dopaquinona (PROTA, 1995).

A eumelanina é formada através de uma série de reações oxidativas a partir do dihidroxindol (DHI) e do ácido dihidroxindol-2-carboxílico (DHICA), os quais são formados a partir do dopacromo. Na presença de cisteína e de glutatona, a dopaquinona é convertida em cisteinildopa ou glutationildopa, a partir das quais a feomelanina (pigmento vermelho) é formada. A quantidade de eumelanina e de feomelanina formadas determina a aparência fenotípica do indivíduo (CHANG, 2009; KIM; UYAMA, 2005). A Figura 2 apresenta o esquema da biossíntese da eu e feo melanina.

Figura 2: Esquema de biossíntese da eumelanina e feomelanina.
(Adaptado de HEARING, 2011).

2.1.2 Melanoma

Durante sua progressão, células de melanoma, atravessam a barreira dermoepidérmica e migram para a derme, principal local da propagação do melanoma (NTAYI; HORNEBECK; BERNARD, 2004). O melanoma cutâneo humano descoberto em seus estágios iniciais é quase sempre curável. Porém, se diagnosticado tardiamente, pode invadir tecidos e órgãos adjacentes, ou distantes gerando metástases e alta mortalidade (FIDLER, 2003).

A resistência aos agentes citotóxicos em células tumorais é um dos mais sérios obstáculos ao sucesso da quimioterapia antineoplásica (GILLET; GOTTESMAN, 2010).

Descobertas referentes a análise do perfil molecular, através de hibridização comparativa de genomas e por análise de mutações por sequenciamento de genes mostram diferentes mutações e alterações em vias de sinalização responsáveis pelo desenvolvimento, progressão e sobrevivência do melanoma (SMALLEY, 2010).

Segundo essas descobertas, parecem haver elementos específicos de certas vias, capazes de transformar os melanócitos e que contribui para o alto poder metastático de certos melanomas. Exemplos de elementos específicos de diferentes vias de sinalização são o KIT, MITF e MCR1 (FIDLER, 2003).

A via de sinalização mediada pelo receptor KIT é essencial para o desenvolvimento do melanócito. Quatro genes que codificam as proteínas desta via são considerados oncogenes para o melanoma: KIT, NRAS, BRAF e MITF. A expressão de MITF pode ser regulada pelo MSH via MCR, WNT e modificações pós –translacionais como adição do peptídeo SUMO. O MITF é fosforilado por MAP-ERK bem como pela proteína quinase S6. Podemos visualizar algumas vias na figura 3 (FLAHERTY et al., 2012).

Figura 3: Principais vias de sinalização no melanócito e no melanoma.
Adaptado de Flaherty et al (2012).

A descoberta de novas rotas gênicas possibilita estratégias de tratamento direcionadas para alvos moleculares específicos para cada tipo de melanoma com determinadas vias de transdução alteradas (como a via de RAS-RAF-MAPK), e a combinação de moléculas direcionadas para estes alvos

pode levar a uma maior eficiência e benefícios terapêuticos (RUSSO et al., 2009; JI; FLAHERTY ; TSAO, 2010).

Um desses alvos específicos, que ocorre em cerca de 60% dos melanomas metastáticos, é a proteína B-RAF, que é mutada no sítio V600E levando a uma proteína com atividade constitutiva (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Essa descoberta levou a aprovação do quimioterápico vemurafenib pela FDA em menos de 10 anos (CHAPMAN et al., 2011). O vemurafenib também conhecido como PLX4032, é um inibidor de BRAF quinase com capacidade seletiva de reconhecimento da mutação oncogênica V600E. Este inibidor de BRAF induz a parada do ciclo celular, inibe proliferação e inicia apoptose exclusivamente em células V600E positivas em sistemas *in vitro* além de estudos xenográficos (LEDFORD, 2010).

Uma descoberta inesperada com relação ao uso de inibidores BRAF quinase foi a ativação da via de sinalização da MAP quinase em células de melanoma que possuíam BRAF selvagem, ou seja, sem a mutação oncogênica V600E. Esse evento ficou conhecido como “Ativação Paradoxal” da via da MAP quinase, ocorrendo aumento da proliferação e reforçando a invasão das células de melanoma, levando a malignidades secundárias (KUDCHACKAR et al., 2012). Essas observações levaram ao desenvolvimento de uma nova geração de inibidores de BRAF, chamados de “paradoxical breakers” impedindo assim a reativação da via da MAP quinase (GIBNEY et al., 2013).

2.1.3 Melanoma e melanogênese

Apesar do entendimento dos mecanismos de resistência ser importante, não explica porquê os melanomas são de fato resistentes à quimioterapia quando comparados a outros tipos de câncer. Uma possível explicação para essa diferença é que o melanoma possui mecanismos adicionais de resistência (CHEN et al., 2006; CHEN et al., 2009).

Chen e colaboradores (2009) propuseram um modelo que mostra a sensibilidade dos fármacos baseado na melanogênese e no mecanismo de MDR (através de transportadores ABC – ATP-Binding Cassete). Os autores analisaram o papel do MDR na melanogênese e na detoxificação da

citotoxicidade melanogênica endógena e a participação dos mesmos na resistência aos fármacos. Segundo estes autores, na fase II, o processo de melanogênese gera o máximo de citotoxicidade. O grau de citotoxicidade é associado com a integridade do melanossomo e a capacidade das células em executar autofagia programada nos melanossomos danificados. Nessa fase, as células de melanoma se tornam mais suscetíveis a fármacos citotóxicos. Esse modelo, portanto, retrata uma ligação entre a melanogênese e sensibilidade de fármacos (figura 4).

Figura 4: Modelo esquemático de resistência a fármacos mediado pelos melanossomos. Os melanossomos apresentam quatro estágios de maturação até a formação da melanina(I- VI). O modelo celular é baseado na biogênese do melanossomo, relacionando as fases de maturação do mesmo com a sensibilidade aos fármacos. Os melanossomos nos estágios iniciais (I-II) e finais. Adaptado de CHEN et al., 2009).

Na pele, o pigmento melanina pode agir como um agente protetor ao diminuir os efeitos danosos da luz UV. Isso se deve ao fato de que a melanina absorve radiação na região UV, mas outras propriedades também parecem contribuir para esse efeito, dentre estas está a capacidade em remover ROS ou inibir sua formação (MARESCA et al., 2008).

Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que a irradiação da melanina por luz UV pode gerar ROS como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH) (KORYTOWSKI et al., 1987).

2.2 Compostos estudados

A cisplatina é um dos agentes quimioterápicos mais eficazes e é amplamente utilizado para o tratamento de tumores malignos como: testículo, ovário, cólon uterino, pulmão, cabeça e pescoço, bexiga, e muitos outros órgãos e tecidos (SIDDIK, 2003, WANG; LIPPARD, 2005; CEPEDA et al., 2007). No entanto, o uso e a eficácia da cisplatina é limitada devido a seus efeitos colaterais, incluindo nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, alopecia, náuseas e vômitos (TAGUCHI et al., 2005; WANG; LIPPARD, 2005; CEPEDA et al., 2007). Consequentemente, o desenvolvimento de um novo derivado da platina (II) que possua perfil farmacológico diferenciado é um dos principais objetivos da indústria farmacêutica .

Derivados de hidantoína possuem uma variedade de propriedades farmacológicas e bioquímicas e são utilizados para o tratamento de diversas doenças. Eles possuem boas propriedades anticonvulsivantes e dependendo da substituição no anel hidantoína, existe uma grande variedade de propriedades farmacológicas incluindo atividade fungicida, herbicida, antitumoral, anti-inflamatória, antiarrítmica e anti-hipertensão. Embora esses derivados sejam estudados extensivamente, não existem muitas pesquisas sobre suas propriedades antitumorais em melanoma (THENMOZHIAL; WONG; CHUI, 2004; DYLAG et al., 2004).

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as atividades citotóxica e melanogênica do complexo de platina (II) com derivado de hidantoína em linhagens de melanoma.

3.1 Objetivos específicos

1. Gerar de curvas de citotoxicidade para os compostos CX42, NN10 e CIS em células de melanoma e células da pele como melanócitos e fibroblastos e queratinócitos imortalizados (HaCat).
2. Avaliar o processo de melanogênese quanto à atividade da tirosinase;
3. Avaliar o papel dos diferentes compostos no comprometimento do ciclo celular;
4. Identificar o mecanismo de morte celular diferenciando-o quanto à via de necrose ou apoptose.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares e culturas primárias

As linhagens de melanoma metastático humano utilizadas neste projeto foram SK-Mel-28 e SK-Mel-103. As células humanas de melanoma foram doadas pela Profa. Dra. Marisol Soengas do Centro Nacional de Investigação Oncológica (CNIO) Madri, Espanha.

A linhagem murina tumoral utilizada foi a B16F10, doadas pelo professor. durvanei maria do instituto butantan, SP. Suas respectivas mutações e características estão listadas na Tabela 1.

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

Gene	Sk-Mel 103	Sk-Mel 28	B16F10
p53	wt*	wt*	wt*
BRAF	wt*	V600E**	wt*
N-Ras	Q61R***	wt*	wt*

***wt**: wild type: Fenótipo típico que ocorre em determinada espécie.

****V600E**: Mutação existente na posição 600 de BRAF, pela substituição do aminoácido valina pelo ácido glutâmico.

*****Q61R**: Mutação existente na posição 61 de N-Ras, pela substituição do aminoácido glutamina por arginina.

As culturas primárias de melanócitos humanos e de fibroblastos humanos foram utilizadas como controle de reação e foram geradas a partir de purificação de fragmentos de pele oriundos de doadores (Registro CEP-HU/USP: 943/09). Durante os ensaios as células foram utilizadas entre passagens de 3 a 7 em experimentos independentes.

4.2 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares, segundo Brohem et al, 2012 (favor incluir na lista bibliográfica)

As células foram cultivadas em estufa de cultura celular a 37°C, em frascos plásticos descartáveis contendo meio de crescimento específico para cada linhagem utilizada, em atmosfera de 5% de CO₂ para a manutenção de pH próximo ao fisiológico. As células foram subcultivadas com aproximadamente 80% da densidade celular, utilizando-se tripsina 0,1% em PBS (tampão fosfato salino contendo 1 mM ácido etileno diamino tetra-acético, EDTA). Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultivo contendo 8% DMSO (dimetilsulfóxido) a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

4.3 Complexo de platina (II) com derivado de hidantoína (CX42)

O CX42 e o NN10 foram sintetizados pelo Professor Ivan da Rocha Pitta (Universidade Federal de Pernambuco). Os compostos CX42 e NN10 foram dissolvidos em DMSO 100%, sendo a concentração de uso determinada para cada ensaio, sendo a concentração máxima utilizada em 100 µM de CX42 de 2% de DMSO por poço. A CIS foi adquirida pela Sigma Aldrich.

Figura 5: Estrutura química dos compostos: CX42, NN10 e CIS.

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

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, baseado na redução do sal de tretazólio, pelo sistema enzimático mitocondrial, por meio da atividade das desidrogenases que clivam o anel tetrazólico e convertem o MTT

em um produto insolúvel denominado formazan, que por sua vez reflete o funcionamento da mitocôndria e, conseqüentemente, a viabilidade celular. As células (B16F10, Sk-Mel 103, Sk-Mel 28) foram plaqueadas 10.000 células em placas de 96 poços por 24 horas, em seguida incubadas com diferentes concentrações do CX42 (1, 10, 25, 50, 75 e 100 μ M) durante 24, 48 e 72 horas. Após essa etapa, o meio foi removido e as células incubadas com uma solução de 5mg/ml de MTT durante 4 horas permitindo a formação do formazan (precipitado) sendo dissolvido em DMSO. A absorbância de cada poço foi lida por um leitor de microplaca em 570 nm, os ensaios foram realizados em octuplicata.(DENIZOT; LANG, 1986).

4.5 Ensaio exclusão por azul de tripan

A citotoxicidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão por corante Azul de Tripan (0,4% em tampão fosfato, PBS), nos quais as células foram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentaram no seu interior a coloração azul. Neste ensaio, foram plaqueadas 30.000 células (Fibroblasto, melanócito, Haca, B16F10, Sk-Mel 103, Sk-Mel 28) por poço, em placas de 24 poços. Após 6 horas, o meio foi retirado e, então, adicionado meio de cultura DMEM acrescido de 10% de SFB. Após 24 horas, foi adicionado meio com as diferentes concentrações de CX42, NN10 e CIS (1, 10, 25, 50, 75 e 100 μ M). Após esta etapa, para leituras de tempos distintos (24 e 48 horas), as células foram coletadas com tripsina e foi adicionado à sua suspensão o corante Azul de Tripan 0,4%, na proporção de 1:2 v/v. As células foram contadas na câmara de Neubauer. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.6 Ensaio Clonogênico

Foram cultivadas 600 células em placas de 60mm de culturas de células. Após 24h, as células já aderidas, foram tratadas com os compostos (CX42, NN10 e CIS) nas concentrações de 10 μ M e tendo sido realizado, após 7 dias, novo tratamento, mantidas em cultura por 14 dias.

Após este período o meio de cultura foi descartado, as placas lavadas com tampão salina fosfato (PBS) e as colônias formadas foram fixadas com solução de glutaraldeído 6% e coradas com 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. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.7 Atividade de tirosinase

O ensaio consiste em um método enzimático a partir do lisado celular das células B16F10. As células foram cultivadas em placas de 6 poços. Após incubação com os compostos CX42, NN10 e CIS por 48h nas concentrações de 25, 50 e 75 μ M, as células foram coletadas e lisadas com tampão fosfato (pH 6,8) contendo 1% de triton X-100 e inibidor de protease (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF 1 mM/ Sigma Aldrich). Os lisados foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford. Após a quantificação, utilizou-se 100 μ g de proteína do lisado celular e adicionou-se 100 μ L do substrato L-DOPA (3mg/mL/ Sigma Aldrich) em placas de 96 poços, em triplicata. A atividade foi então avaliada pela medição da produção de intermediários da via melanogênica pela leitura espectrofométrica a 475 nm (Biotek, Synergy HP) (adaptado de HEARING, 1987). Como controle positivo da reação foi utilizado o isometilbutilxantina (IBMX/ Sigma Aldrich) e controle de inibição o 1-phenyl-2-thiourea (PTU). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

As células B16F10, SkMel 28, SkMel 103, fibroblasto e HaCat foram cultivadas em placas de 6 poços em 3×10^4 células/mL, por poço com DMEM e 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 24h de plaqueamento, foi retirado todo o meio e adicionado somente DMEM sem SFB, com a finalidade de sincronizar todas as células. Após 24 horas, foram tratadas com os compostos CX42 e NN10 na concentração de 50 μ M. Após 24h e 48h de tratamento as células foram coletadas.

Após a coleta das células aderidas e aquelas presentes no sobrenadante foram passadas para tubos cônicos e centrifugadas a 1000 rpm,

por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi lavado e ressuspensão com PBS gelado. Após nova centrifugação a 1000 rpm por 3 minutos, as células foram resuspensas em tampão de lise (PBS contendo 10mg/mL de RNase, 0,1% de triton x-100 e 50µg/mL de Iodeto de Propídio).

Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a fluorescência foi analisada em citômetro de fluxo (FACSCanto Beckton Dickinson, CA, USA) em canal FL2 - 620nm e 10.000 eventos foram analisados pelo *software* FlowJo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.9 Necrose e Apoptose

As células foram cultivadas com meio DMEM e 10% de SFB em placas de 6 poços. Para a linhagem murina B16F10, um ensaio foi realizado estimulando a pigmentação com DMEM + 25µM IBMX por 24h. Após este período, as células foram tratadas com os compostos CX42, NN10 e CIS na concentração de 50 µM por mais 24h. Para o outro ensaio, foi realizado com a estimulação da pigmentação, realizando somente o tratamento com os compostos estudados. Após 24h, o meio foi removido e as células foram marcadas com Anexina V conjugada com um fluorocromo FITC e PI. As amostras foram analisadas em citometria de fluxo (FACSCanto Beckton Dickinson), e os histogramas analisados pelo *software* FlowJo. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.10 Senescência

Foram plaqueadas as células B16F10 em placas de 6 poços até atingirem 50% de confluência. Lavou-se então a monocamada com PBS e a fixação foi feita com 0,5% glutaraldeído em PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação foram feitas duas lavagens com PBS contendo 1 mM MgCl₂. A seguir foi feita a incubação a 37°C, protegido da luz, com a solução de coloração com X-Gal (PBS contendo 1mM MgCl₂, 0,12 mM K₃Fe(CN)₆, 0,12 mM K₄Fe(CN)₆· 3H₂O e X-Gal 1 mg/mL) por 4 horas ou até o surgimento de células com coloração azulada. Ao final da reação as células foram lavadas três vezes com PBS e as placas armazenadas a 4°C protegidas da luz. Para

avaliar a senescência, foram contadas as células com citoplasma azulado. O experimento foi acompanhado por até 24h (DIMRI et al., 1995; DEBACQ-CHAINIAUX et al., 2009). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.11 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) de 6-9 determinações de 2 – 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad-Prism 5, versão 2007 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). Quando múltiplas amostras foram comparadas com uma única variável independente, *One-way* ANOVA com pós-teste de Newman–Keuls foi realizado. Dados com duas variáveis independentes foram comparados com *Two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni, como indicado em cada legenda. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para a realização do cálculo do IC_{50} (viabilidade celular em 50% das células) foi utilizado o software Graph-Prism 5, versão 2007, analisados por regressão não- linear (*Non fit of IC50*).

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular

5.1.1 CX42 diminui a viabilidade das células de melanoma avaliada por MTT

Foi determinada a citotoxicidade do CX42 avaliada pelo ensaio do MTT para as linhagens de melanoma SK-Mel 103, Sk-Mel 28 e B16F10 com a finalidade de verificar se o composto seria tóxico nessas linhagens de células de melanoma (Figura 6). As linhagens foram cultivadas com o CX42 nas concentrações de 1 a 100 μM por 24h, 48h e 72h.

Pelos resultados da densidade ótica em relação ao controle de cada uma das linhagens, pode-se observar um efeito citotóxico por tempo dependente para as linhagens tumorais, sendo esse efeito maior na linhagem B16F10.

A partir da curva de citotoxicidade por MTT com as diferentes concentrações do composto CX42 se pôde calcular a concentração na qual ocorreu diminuição da viabilidade celular de 50% das células (IC_{50}) para cada evento de 24, 48 e 72 horas nas diferentes linhagens (Tabela 2).

Tabela 2 : Valores de IC_{50} em μM utilizando a metodologia de MTT em 24, 48 e 72 horas para Sk-Mel 103, Sk-Mel 28 e B16F10.

Horas	Sk-Mel 103	Sk-Mel 28	B16F10
24	>100	>100	51.4
48	>100	>100	54.49
72	>100	>100	55.91

Figura 6: Efeito citotóxico do CX42 na linhagem Sk Mel 103 por 24, 48 e 72h. Os valores foram expressos em média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=3 em octuplicata).

5.1.2 Atividade citostática do composto CX42 em células de melanoma

Diante dos resultados de MTT, foi realizada também a avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de exclusão por azul de tripan. Nesse ensaio, entretanto, foram utilizados os três compostos estudados (CX42, NN10 e CIS). O CX42 apresentou seletividade para as células tumorais, fato que não é observado com o derivado de hidantoína isolado (NN10) e com a CIS (figura 7 e 8). A CIS apesar de possuir um IC_{50} menor com relação ao CX42, também apresenta um perfil citotóxico nas células da pele (Tabela 3). Deve ser ressaltado ainda que durante a realização dos ensaios com o CX42 não foram visualizadas células destacadas ou mortas, mas sim uma diminuição do número de células, mostrando um perfil citostático e não citotóxico. Pode-se visualizar as imagens das células na figura 9.

Tabela 3: Valores de IC_{50} em μM utilizando a metodologia de MTT após 24 horas de tratamento.

	NN10	CIS	CX42
B16F10	>100	35	51.4
Sk-Mel 28	>100	77	54.49
Sk-Mel 103	>100	28	55.91
Fibroblasto	>100	60	>100
Hacat	>100	55	>100
Melanócito	>100	28,3	>100

Figura 7: Efeito Citostático dos compostos nas células estudadas. Tempo de incubação 24h. Os valores foram expressos em média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=3 em triplicata). Two-way ANOVA foi realizado).

Figura 8: Efeito citostático dos compostos nas células estudadas. Tempo de incubação 48h. Os valores foram expressos em média $\pm$ SD de três experimentos independentes (n=3 em triplicata). Two-way ANOVA foi realizado).

Figura 9: Fotomicrografia das células com tratamento com os diferentes compostos. Tempo de incubação de 24h, com os compostos na concentração de 50 μ M. As imagens foram obtidas no aumento de 40X em microscópio ótico. As alterações na morfologia celular são consequência da exposição aos compostos estudados.

5.1.3 Diminuição da formação de colônias após tratamento com o composto CX42 nas células de melanoma

A figura 10 demonstra o comportamento das células após 14 dias de exposição com os compostos. Vale ressaltar que a concentração utilizada no ensaio clonogênico foi a concentração na qual houve pelo menos 10% de diminuição da viabilidade celular para o composto CX42, ou seja, na concentração de 10 μ M. Desta forma, para os outros 2 compostos também foram utilizadas a mesma concentração para gerar um perfil comparativo.

Podemos observar que nas linhagens de melanoma houve uma diminuição do número de colônias para o composto CX42, já para as células da pele não houve alteração na formação de colônias. Para o NN10 não foram observadas mudanças no número de colônias, enquanto a CIS apresentou um perfil tóxico para todas as células estudadas. Estes dados corroboram os resultados dos ensaios de exclusão por azul de tripan.

Figura 10: Ensaio clonogênico. Crescimento de colônias das células B16F10, Sk-Mel 103, Sk-Mel 28, fibroblasto e HaCat ,após tratamento de 14 dias com os compostos na concentração de 10 μ M.

5.2 Ciclo Celular

Os resultados anteriores relacionados à diminuição da viabilidade celular das células de melanoma apontam para uma atuação do CX42 no ciclo celular. Desta forma foi realizada análise de DNA marcado com IP a fim de evidenciar as células em cada fase do ciclo celular.

Com a análise de três experimentos independentes foi possível quantificar a porcentagem das populações de células nas diferentes fases do ciclo celular de forma comparativa, excluindo-se as células em Sub G1. É possível notar a predominância de célula na fase G0/G1 do ciclo celular na concentração de 50 μ M para o CX42 para as células de melanoma, sendo que no fibroblasto e Haca esse efeito não foi observado. Como controle, as células foram privadas de SFB, mostrando que há uma parada no ciclo celular na fase G0/G1 em 24h. Nas células HaCat, com o tratamento do com posto CX42, houve um aumento na fase S. (Figura 11-15).

Figura 11: Diferentes fases do ciclo celular de células B16F10 tratadas com CX42 e NN10 na concentração de 50 μ M. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h e 48h de tratamento com os compostos. B. Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M, branco. Três experimentos independentes em duplicata (n=9) (p<0,001 em relação ao controle. Two-way ANOVA foi realizado).**

Figura 12: Diferentes fases do ciclo celular de células Sk-Mel28 tratadas com Cx42 e NN10 na concentração de 50 μ M. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h e 48h de tratamento com os compostos. B. Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M, branco. Três experimentos independentes em duplicata (n=9) (p<0,001 em relação ao controle. Two-way ANOVA foi realizado).**

Figura 13: Diferentes fases do ciclo celular de células Sk-Mel103 tratadas com CX42 e NN10 na concentração de 50 μ M. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h e 48h de tratamento com os compostos. B. Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M, branco. Três experimentos independentes em duplicata (n=9) (p<0,001 em relação ao controle. Two-way ANOVA foi realizado).**

Figura 14: Diferentes fases do ciclo celular de células HaCat tratadas com CX42 e NN10 na concentração de 50 μ M. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h tratamento com os compostos. B. Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M, branco. Três experimentos independentes em duplicata (n=9) (p<0,001 em relação ao controle. Two-way ANOVA foi realizado).**

Figura 15: Diferentes fases do ciclo celular de células de fibroblasto tratadas com CX42 e NN10 na concentração de 50 μ M. A. Histograma da citometria de fluxo mostrando as populações de células nas diferentes fases do ciclo celular após 24h e 48h de tratamento com os compostos. B. Porcentagem de células em cada fase do ciclo. G0/G1, cinza escuro, S, cinza claro, G2/M, branco.. Três experimentos independentes em duplicata (n=9).

5.3 Avaliação da atividade Melanogênica

Devido ao conhecimento de que derivados de hidantoína podem modular a via melanogênica, foram realizados ensaios para verificar se o composto estaria de fato alterando a via da melanogênese por meio da modulação da atividade da tirosinase.

O fato do composto CX42 modular a via da melanogênese, pode ser evidenciado desde os primeiros ensaios de viabilidade celular utilizando a metodologia de exclusão por azul de tripan. Durante o procedimento do ensaio, foi possível observar a coloração dos *pellets* celulares frente o tratamento com o composto CX42(Figura 16).

Figura 16: Fotografia dos *pellets* celulares da linhagem B16F10 durante o procedimento do ensaio de exclusão por azul de tripan com tratamento do CX 42 por 48h

A linhagem celular B16F10 foi tratada com CX42 nas concentrações de 25, 50 e 75 μM . A melanogênese é regulada pela atividade da tirosinase, enzima chave na produção de melanina. Portanto, foi examinado o efeito do composto CX 42, do IBMX, do PTU na atividade da tirosinase. A figura 17 mostra a atividade da tirosinase dos compostos, IBMX, PTU e também do composto de interesse CX42. De acordo com o resultado do CX 42, sugere-se que a mudança da coloração das células seja devido a atividade da tirosinase.

Figura 17: Efeito dos compostos sobre a atividade da tirosinase na linhagem B16F10. A atividade da tirosinase foi expressa em porcentagem em relação ao controle não tratado (0). Os valores foram expressos em média $\pm$ SD de 2 experimentos independentes ($n=2$ em duplicata). (***) $p<0,001$ versus controle. One-way ANOVA foi realizado).

Figura 18: Fotografia dos pellets celulares da linhagem B16f10 com tratamento com os compostos por 48h na realização do ensaio da tirosinase.

5.4.Senescência

Neste ensaio foi utilizada a linhagem B16F10 tratada com CX42 e NN10 na concentração 50 μ M, observou-se que tanto o controle NT quanto as células não estão senescentes, dado o pequeno número de células com coloração azulada (figura 19).

Figura 19 Fotomicrografia para determinação da senescência. A linhagem estudada foi submetida a reação com X-Gal, que gera marcação azulada em células senescentes. Como controle positivo da reação foi utilizado a doxorubicina na concentração de 5µg/ML.

5.5 Identificação do tipo de morte celular induzida (apoptose, necrose) pela ação do CX42 na linhagem murina B16F10.

5.5.1 Avaliação do tipo de morte celular (apoptose/necrose)

Com base nos resultados obtidos, optou-se por focar no mecanismo de morte celular do composto CX42 na linhagem murina B16F10. Esse ensaio foi realizado com as células de melanoma murino B16F10, com estágio basal de pigmentação e com estimulação da pigmentação com o composto IBMX.

Após essa estimulação as células foram expostas ao CX42 por 24h e foram realizados os ensaios de morte. Observou-se que, quando as células estão mais pigmentadas (após tratamento com o estimulador de

melanogênese- IBMX), frente ao tratamento com CX42, apresentaram um aumento na morte celular por apoptose de 40%. (Figuras 20 e 21).

Figura 20 Determinação da morte celular por citometria de fluxo em células B16F10. As células foram tratadas com os compostos por 24h e analisadas. **A.** Histogramas representam as melhores leituras. **B.** Valores expressos em percentual de células viáveis (AFITC/PI negativo, cinza), células em apoptose (AFITC positivo, preto), células em necrose (PI positivo) e células em apoptose e necrose (AFITC/ PI positivo, em branco com listras). Foram realizados 3 experimentos independentes, n=9). **C.** Fotomicrografia dos tratamentos.

Figura 21 Determinação da morte celular por citometria de fluxo em células B16F10. As células foram tratadas previamente com IBMX para estimular a melanogênese e posteriormente com os compostos por 24h e analisadas. **A.** Histogramas representam as melhores leituras. **B.** Valores expressos em percentual de células viáveis (AFITC/PI negativo, cinza), células em apoptose (AFITC positivo, preto), células em necrose (PI positivo) e células em apoptose e necrose (AFITC/ PI positivo, em branco com listras). Foram realizados 3 experimentos independentes, n=9), (***) $p < 0,001$ em relação ao controle). **C.** Fotomicrografia dos tratamentos.

5.5.2 Dados de correlação: Apoptose x Atividade da Tirosinase

A Análise de Correlação é um método estatístico utilizado para estudar o grau de relacionamento entre variáveis. A análise de correlação fornece um número, indicando a variação conjunta das duas. O presente estudo teve como objetivo correlacionar a morte celular por apoptose com o aumento da atividade da enzima tirosinase. Pelo valor do coeficiente de Pearson, pode-se verificar que há uma correlação entre as duas variáveis estudadas.

Figura 22: Gráfico de correlação entre apoptose e Atividade da tirosinase, ambos expressos em porcentagem. $r^2 = 0,97$

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, o complexo de platina (II) com derivado de hidantoína CX42 diminuiu a viabilidade celular em linhagens de melanoma humano e murino. Seu efeito foi mais intenso quando as células B16F10 apresentavam-se pigmentadas, demonstrando indução da tirosinase e da morte celular. Ainda, foi observada seletividade, avaliada com células da pele (fibroblastos, melanócitos e queratinócitos).

Esperando-se contribuir para o reconhecimento de novas moléculas antitumorais, a atividade biológica do composto CX42 foi estudada. Foram realizados experimentos em linhagens de melanoma, assim como células da pele (fibroblastos, queratinócitos e melanócitos). Ainda, o derivado de hidantoína isolado NN10 e a cisplatina foram comparados ao composto estudado.

Quanto aos tipos de ensaios de citotoxicidade, pode-se verificar uma diferença nos resultados do IC₅₀ dos ensaios de MTT, comparando com os resultados dos ensaios de exclusão por azul de tripan. Essa diferença pode ser explicada pelo fundamento de metodologia de cada ensaio.

Outro ponto importante na utilização do ensaio de exclusão por Azul de tripan, é que durante o procedimento pode-se observar fatos importantes para o desenvolvimento da pesquisa, como a visualização da mudança de coloração dos *pellets* na linhagem B16F10 e a diminuição de células viáveis na contagem no microscópio.

No ensaio clonogênico, o mesmo perfil de viabilidade celular foi confirmado, quando comparado com o ensaio de exclusão por azul de tripan. O ensaio clonogênico testa a habilidade de uma única célula se dividir em uma colônia, obtendo-se no mínimo 50 células por colônia. Esse ensaio é frequentemente utilizado para avaliar a capacidade de sobrevivência celular, determinando de forma satisfatória a citotoxicidade de agentes. O ensaio detecta todas as células que possuem sua capacidade reduzida de produzir um vasto número de progenitores devido à exposição a um agente químico que

pode causar morte das células em detrimento de danos nos cromossomos e consequente apoptose (FRANKEN et al., 2006).

O CX42 mostrou efeito dose-dependente nas linhagens estudadas, principalmente para a linhagem B16F10, além de apresentar efeito citostático. O fato do CX42 apresentar-se mais citostático para essas linhagens sugere atuação na via melanogênica, sensibilizando células de melanoma.

Chen e colaboradores (2009) propuseram uma relação positiva entre o grau de citotoxicidade endógena melanossômica (produzida durante a síntese de melanina) com os estágios avançados do desenvolvimento do melanossomo (estágio III e IV). O grau de sensibilização dessas linhagens melanóticas nesse estágio foi relacionado com o mecanismo de MDR. Desta forma, a manipulação da dinâmica dos melanossomos, através da utilização de um inibidor da tirosinase, pode regular o crescimento celular e a resistência de um fármaco.

Foi observada atividade citostática do CX42 em células de melanoma e consequente morte por apoptose em linhagens pigmentadas. Estudos anteriores, demonstraram atividade semelhante (citotóxica e citostática) de derivados de espirohidantoína em células de câncer de mama e próstata. Já em células leucêmicas, esses mesmos derivados inibiram o crescimento destas células com consequente indução de morte celular por apoptose (KAVITHA et al., 2009).

A melanogênese é uma das maiores funções das células pigmentadas, tanto para melanócitos, como para as células de melanoma, sendo a tirosinase a enzima chave para o processo da melanogênese (HAH et al., 2012). Neste estudo, foi avaliada a atividade da tirosinase de células de melanoma expostas ao CX42 por 48h, pois nesse período, foi possível verificar uma atividade significativa da enzima em melanócitos e na linhagem melanótica B16F10.

Para o mesmo ensaio foram utilizados como controle, o IBMX na indução da atividade da tirosinase (KOO et al., 2002) e o PTU como um inibidor da atividade da enzima (CHEN et al., 2009). Comparativamente, Hah e colaboradores (2012) verificaram indução da melanogênese pela rapamicina em linhagem de melanoma melanótico humano. O IBMX ativa a

melanogênese, associado com o aumento da atividade da tirosinase. O IBMX aumenta o AMP_c pela inibição da enzima fosfodiesterase (BEAVO et al., 1970).

O CX42 foi capaz de induzir parada no ciclo celular em G0/G1 nas linhagens de melanoma. Já isso não pode ser observado nas células da pele, como fibroblasto e Hacat.

A senescência é discutida como um mecanismo chave de supressão tumoral, particularmente por estudos que demonstram a existência de células senescentes em linfomas, melanomas, câncer de mama, pulmão, entre outros (SARKISIAN et al., 2007). Porém, os dados do ensaio deste ensaio demonstram que o CX42 não teve efeito como um indutor de senescência na linhagem B16F10.

A morte celular programada do tipo apoptótica leva à externalização de um fosfolipídeo que é reconhecido pela Anexina V. Este fosfolipídeo é a fosfatidilserina, cuja externalização caracteriza a morte celular por apoptose. A Anexina V ligada a um fluorocromo (FITC ou APC) pode se ligar à fosfatidilserina das células apoptóticas e marcá-las. Outra característica da apoptose é a integridade da membrana nos seus estádios iniciais.

Desta forma, pode ser feito o uso do PI para distinguir as células com membrana íntegra ou fragmentada. Assim, as células vivas não apoptóticas não serão marcadas com nenhuma fluorescência. As células apoptóticas com membrana íntegra serão marcadas somente com o fluorocromo ligado à Anexina V, e as células com membrana fragmentada (necróticas ou em apoptose tardia) serão duplamente marcadas (Anexina V e PI).

Nos ensaios de morte celular por apoptose/ necrose foram realizadas comparações com relação à pigmentação. Quando a linhagem murina B16F10 foi pré-estimulada por 48h com o IBMX para a síntese de melanina, houve um aumento de 40% na morte por apoptose, demonstrando que existe uma seletividade do composto CX42 para a linhagem melanótica e essa seletividade é ainda maior quando as mesmas células estão em um estágio de produção de melanina.

Ainda, o gráfico de correlação para esses dois eventos (expressão de tirosinase e presença de apoptose) foi apresentado. Pelo dado de correlação de coeficiente de Pearson, pode-se analisar que de fato existe uma conexão entre a morte celular por apoptose e a atividade da enzima tirosinase.

7 CONCLUSÕES

- O composto CX42 diminui a viabilidade celular no melanoma, principalmente da linhagem murina B16F10;
- O composto CX42 apresentou perfil citostático nas linhagens de melanoma estudadas, evidenciado pelo ensaio de avaliação de ciclo celular;
- O CX42 causou ativação da enzima tirosinase caracterizando um aumento na pigmentação. Este aumento também pode ser observado na coloração dos *pellets* celulares;
- O composto CX42 apresenta aumento significativo na morte celular por apoptose quando as células da linhagem de melanoma B16F10 foram estimuladas com IBMX.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MALEK, Z.; KADEKARO, A. L.; SWOPE, V. B. Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure. **Pigment Cell Melanoma Research**. n. 23, p. 171–186, 2010.

BEAVO, J.A.; ROGERS, N.L.; CROFFORD, O.B.; HARDMAN, J.G.; SUTHERLAND, E. W.; NEWMAN, E.V. Effects of xanthine derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. **Molecular Pharmacology**. n.6, v.6, p.597–603, 1970.

BERTOLOTTO, C.; BUSCÀ, R.; ABBE, P.; BILLE, K.; ABERDAM, E.; ORTONE, J.P.; BALLOTTI, R. Different cis-Acting Elements Are Involved in the Regulation of TRP1 and TRP2 Promoter Activities by Cyclic AMP: Pivotal Role of M Boxes (GTCATGTGCT) and of Microphthalmia. **Molecular Cell Biology**.n.18, p.694 – 702, 1998.

BOROVANSKÝ, J.; MIREJOVSKÝ, P.; RILEY, P.A. Possible relationship between abnormal melanosome structure and cytotoxic phenomena in malignant melanoma. **Neoplasma**. n.38, v.4, p.393-400,1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa da Incidência de Câncer no Brasil - 2012. Rio de Janeiro. INCA, 2012. 118p.

BUSCÀ, R.; BALLOTTI, R. Cyclic AMP a Key Messenger in the Regulation of Skin Pigmentation. **Pigment Cell Melanoma Research**. n.13, p. 60 – 69, 2000.

CEPEDA, V.; FUERTES, M.A.; CASTILLA, J.; ALONSO, C.; QUEVEDO, C.; PÉREZ, J.M. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anticancer Agents Medical Chemistry**. n.7, v.1, p.3-18, 2007.

CHANG, T. S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**.n.10, p.2440- 2475, 2009.

CHAPMAN, P.B.; HAUSCHILD, A.; ROBERT, C. et al. (102 colaboradores). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **The New England Journal of Medicine**. n.364, v. 26, p. 2507-16, 2011.

CHEN, K.G.; LEAPMAN, R.D.; ZHANG, G.; LAY, B.; VALENCIA, J.C.; CARDARELLI, C.O.; VIEIRA, W.D.; HEARING, V.J.; GOTTESMAN, M.M. Influence of Melanosome Dynamics on Melanoma Drug Sensivity. **Journal of National Cancer Institute**. n.101, p.1259-1271, 2009.

CHEN, K.G.; VALENCIA, J.C.; LAI, B.; ZHANG, G.; PATERSON, J.K.; ROUZAUD, F.; BERENS, W.; WINCOVITCH, S.M.; GARFIELD, S.H.; LEAPMAN, R.D.; HEARING, V.J.; GOTTESMAN, M.M. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. **Proctual Natl Academy Science**. n.103, v.26, p. 9903-7, 2006.

COSTIN, G.E.; HEARING, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress, **The Journal of the Federation of American Society of Experimental Biology**. n. 21, p. 976-994, 2007.

DAKOUR, J.; VINAYAGAMOORTHY, T.; JIMBOW, K.; CHEN, H.; LUO, D.; DIXON, W.; MUNOZ, V. Identification of a cDNA coding for a Ca(2+)-binding phosphoprotein (p90), calnexin, on melanosomes in normal and malignant human melanocytes. **Experimental Cell Research**. n.209, v.2, p. 288-300, 1993.

DEBACQ-CHAINIAUX, F.; ERUSALIMSKY, J.D.; CAMPISI, J.; TOUSSAINT, O. Protocols to detect senescence-associated β -galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nature Protocols**. 4: 1798–1806. 2009

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunology Methods**. n.89, p.271-277, 1986.

DIMRI, G.P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO E.E.; LINSKENS, M.; RUBELJ, I.; PEREIRA-SMITH, O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. n.20, p.9363-7, 1995.

DYLAG, T.; ZYGMUNT, M.; MACIAG, D.; HANDZLIK, J.; BEDNARSKI, M.; FILIPEK, B.; KIEĆ-KONONOWICZ, K. Synthesis and evaluation of in vivo activity of diphenylhydantoin basic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. n.39, v.12, p. 1013-27, 2004.

EL-MOFTY, M.A.; ESMAT, S.H.S.; ALDEL-HALIM, M.R. Vitiligo and Its Treatment. **Dermatological Clinic**. n.25, p. 401-417, 2007.

FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nature Reviews**. n.3, p. 1-6, 2003.

FLAHERTY, K.T.; HODI, H.S.; FISHER, F.D. From genes to drugs: target strategies for melanoma. **Nature Review/ Cancer**. n.12, p.349-361, 2012.

FRANKEN, N.A.; RODERMOND, H.M.; STAP, J. HAVEMAN, J.; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**. n.1, v.5, p.2315-9, 2006

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews**. n.3, p. 199-209, 2002.

GIBNEY, G.T.; MESSINA, J.L. Fedorenko, I.I.; Vernon, K.; Sondak, V.; Smalley, K. Paradoxical oncogenesis--the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**. v.7, n.10, p. 390-9, 2013.

GILLET, J.P.; GOTTESMAN, M.M. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. **Methods in Molecular Biology**. n.586, p.47-76, 2010.

GREINERT, R. Skin Cancer: New Markers for Better Prevention. **Pathobiology**. v.76, n.2, p.64-81, 2009.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**. v.22, n.44, p.851-7, 2007.

HA, Y.M.; KIM, J.A.; PARK, Y.J.; PARK, D.; KIM J.M.; CHUNG, K.W.; LEE, E.K.; CHUNG, H.Y. Analogs of 5-(substituted benzylidene)hydantoin as inhibitors of tyrosinase and melanin formation. **Biochimica Biophysica Acta**. V.6, p. 612-619, 2011.

HEARING, V.J. Determination of Melanin Synthetic Pathways. **Journal of Investigative Dermatology**. n.131, p. 8–11, 2011.

HEARING, V. J. Jr. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed. In S. Kaufman (Ed.). *Methods in enzymology*. **New York: Academic Press**. n.142, p.154–165, 1987.

HEARING, V.J.; PHILLIPS, P.; LUZTNER, M.A. The fine structure of melanogenesis in coat color mutants of the mouse. **Journal Ultrastructural Research**. n.106, p.43:88, 1973.

IBRAHIM,N.; HALUSKA, F.G. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Annual Review of Pathology**. Boston, v.4, p. 551-79, 2009.

JI, Z.; FLAHERTY, K.T.; TSAO, H. Molecular therapeutic approaches to melanoma. **Molecular Aspects Medical**. n.31, v.2, p.194-204. 2010.

KAVITHA, C.V.; NAMBIAR, M.; ANANDA KUMAR, C.S.; CHOUDHARY, B.; MUNIYAPPA, K.; RANGAPPA, K.S.; RAGHAVAN, S.C. Novel derivatives of spirohydantoin induce growth inhibition followed by apoptosis in leukemia cells. **Biochemycal Pharmacology**. n.1, v.77, p.348-63, 2009.

KIM, J.Y.; UYAMA, C. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future **Cell. Molecular. Life Science**. n.62, p.1707–1723, 2005.

KORYTOWSKI, W.; PILAS, B.; SARNA, T.; KALYANARAMAN, B. Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. **Photochemistry and Photobiology**.n. 4, v. 2, p. 185-90, 1987.

KUDCHADKAR, R.; PARAISO, K.H.; SMALLEY, K.S. Targeting mutant BRAF in melanoma: current status and future development of combination therapy strategies. **Cancer Journal**. n.18, v.2, p.124-31, 2012.

KUPPER, T.S.; FUHLBRIGGE, R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Review Immunology**. n4, p. 211–222, 2004.

KUSHIMOTO, T.; BASRUR, V.; VALENCIA, J.; MATSUNAGA, J.; VIEIRA, W.D, FERRANS, V.J, MULLER, J.; APPELLA, E.; HEARING, V. A. model for melanosomebiogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. **Proceedings of the National Academy of Science**. n.98, v.19, p.10698-10703, 2001.

KVAM, E.; TYRRELL, R.M. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**.n.113, v.2, p.209-13, 1999.

LEE, J.; JUNG, E.; LEE, J.; HUH, S.; BOO, Y. C.; KIM, Y. S.; PARK, D. Mechanism of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone. **British Journal of Dermatology**. N.157, p. 242-248, 2007.

LIN, J.Y.; FISHER, D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**. n. 22, v. 45. P. 843-50, 2007.

MARESCA, V.; FLORI, E.; BRIGANTI, S.; MASTROFRANCESCO, A.; FABBRI, C.; MILEO, A.M.; PAGGI, M.G.; PICARDO, M. Correlation between melanogenic and catalase activity in in vitro human melanocytes: a synergic strategy against oxidative stress. **Pigment Cell Melanoma Research**. n.21, v.2, p. 200-5, 2008.

MAIURI, M.C.; CRIOLLO, A.; KROEMER, G. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the beclin 1 interactome. **The EMBO Journal**. n.229, p.515-516, 2010.

MARKS, M.; SEABRA, M.C. The melanosome: Membrane dynamics in black and white. **Molecular Cell Biology**. n.2, p.1–11, 2001.

NAMAZI, M.R. Phenytoin as a novel anti-vitiligo weapon. **Journal of Autoimmune Disease**. n.2, v.11, p.1-4, 1995.

NCI. National Cancer Institute. Bethesda, MD, USA. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010. Acesso em: 3 jul. 2013.

NICOLAUS, B.J. A critical review of the function of neuromelanin and an attempt to provide a unified theory. **Medical Hypotheses**. n.65, v.4, p.791-6, 2005.

NTAYI, C.; HORNEBECK, W.; BERNARD, P. Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) in cutaneous melanoma progression. **Pathology Biology**. n.52, p. 154-159. 2004.

PARK, H.Y.; KOSMADAKI, M.; YAAR, M.; GILCHREST, B A. Cellular mechanism regulating human melanogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**. n.9, v.66, p. 1493-1506, 2009.

PROTA, G. The chemistry of melanins and melanogenesis. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. n.64, p.93–148, 1995.

RUSSO, A.E.; TORRISI, E.; BEVELACQUA, Y.; PERROTTA, R.; LIBRA, M.; MCCUBREY, J.A.; SPANDIDOS, D.A.; STIVALA, F.; MALAPONTE, G. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies. **Journal of Oncology**. n.34, v.6, p.1481-9, 2009.

SARKISIAN, C.J., KEISTER, B.A., STAIRS, D.B., BOXER, R.B., MOODY, S.E.; CHODOSH, L.A. Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. **Nature Cell Biology**. n. 9, p.493–505, 2007.

SCHERER, D.; KUMAR, R. Genetics of pigmentation in skin cancer — A review. **Mutation Research**. n. 705, v.2, p. 141-53, 2010.

SHIAFFINO, M.V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. n.42, p.1094-1104, 2010.

SIDDIK, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**. n.22, v.47, p.7265-79, 2003.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D.J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiology Review**. n.84, p.1155-1228, 2004.

SMALLEY, K.S.M. Understanding melanoma signaling networks as the basis of molecular targeted therapy. **Journa.l of Investigative Dermatology**. n.130, v.1, p.28-37, 2010.

SOLANO, F.; BRIGANTI, S.; PICARDO, M.; GHANEM, G. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. **Pigment Cell Melanoma Research**. n.19, p. 550-571, 2006.

SPENGLER, G.; EVARISTO, M.; HANDZLIK, J.; MOLNÁR, J.; VIVEIROS, M.; KIÉC-KONONOWICZ, K.; AMARAL, L. Biological activity of hydantoin derivatives on P-glycoprotein (ABCB1) of mouse lymphoma cells. **Anticancer Research**. n.30, v.12, p.4867-71, 2010

SUZUKAWA, A.A.; VIEIRA, A.; WINNISCHOFER, S.M.; SCALFO, A.C.; DI MASCIIO, P.; FERREIRA, A.M.; RAVANAT, J.L.; MARTINS, D.D.E. L.; ROCHA, M.E.; MARTINEZ, G.R. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. **Free Radical Biology & Medicine**. n. 59, v.9, p.1945-53, 2012.

TACHIBANA, M. Sound Needs Sound Melanocytes to Be Heard. **Pigment Cell Melanoma Research**. n.12, p.344–354, 1999.

TAGUCHI, T.; NAZNEEN, A.; ABID, M.R.; RAZZAQUE, M.S. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. **Contributions to Nephrology**. n.148, p.107-21, 2005.

THENMOZHIAL, J.C.; WONG, P.T.; CHUI, W.K. Anticonvulsant activity of phenylmethylenhydantoins: a structure-activity relationship study. **Journal of Medicinal Chemistry**. n. 47, v.6, p. 1527-35, 2004.

TOLNAI, S.A. A method for viable cell count. **Method Cell Science**. n. 1, p.37–38, 1975

WEI, M.L. Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function. **Pigment Cell Melanoma Research**. n.19, p.19, 2006.

WANG, D.; LIPPARD, S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Review Drug Discovery**. n.4, v.4, p.307-20, 2005.

XIE, T.; NGUYEN, T.; HUPE, M.; WEI, M.L. Multidrug resistance decreases with mutations of melanosomal regulatory genes. **Cancer Research**. n.69, v.3, p.992-9, 2009.

YAMAGUCHI, Y.; BRENNER, M.; HEARING, V.J.; The Regulation of skin pigmentation. **Journal of Biology Chemistry**. n.282, p. 27557-27561, 2007.

ANEXOS

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

Titulo 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 Branca 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

Universidade de São Paulo

**Faculdade de Ciências
Farmacêuticas**

**Documento sem validade
oficial**

FICHA DO ALUNO

9141 - 7493595/1 - Fernanda Branco Filippin

Email: fernandafilippi
n@usp.br

Data de Nascimento: 08/05/1985

Cédula de Identidade: RG -
7.344.905-7 - PR

Local de Nascimento: Estado do
Paraná

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Universidade do Vale do Itajaí - Santa
Catarina - Brasil - 2010

Curso: Mestrado

Programa: Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Data de Matrícula: 1
0/06/2011

Prazo: **Início da Contagem de** 1
0/06/2011

Data Limite: 1
0/12/2013

Orientador: Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky -
10/06/2011 a 14/09/2011 E.Mail: sfarsky@usp.br

Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria Engler - 15/09/2011
até o presente. E.Mail: silvy@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em
10/06/2011

Data de Aprovação no Aprovado em
Exame de Qualificação: 12/07/2012

**Data do Depósito do
Trabalho:**

Título do Trabalho:

Data Máxima para
Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da
Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ingressou no Mestrado em 10/06/2011
Ocorrências: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Impresso em: 27/06/13 18:42:53

- Sistema Administrativo da Pós-
Graduação

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9141 - 7493595/1 - Fernanda Branco Filippin

Matrícula	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Red.	Req.	Onc.	Exc.	Situação
BQ5715-5/3	Planejamento de Aulas Práticas de Bioquímica e Biologia Molecular de (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	08/08/2011	31/10/2011	20	1	00			C oncluída
BC5802-2/6	F Tópicos Avançados em Toxicologia I	09/08/2011	29/11/2011	0	3	5			C oncluída
BC5802-2/6	F Sistemas de Garantia da Qualidade	05/02/2012	18/02/2012	0	3	00			C oncluída

2/1	Qualidade em Laboratórios Analíticos								
BC5784-2/7	F Tópicos Avançados em Toxicologia II	0	2	3			00	C	oncluída
IF5770-3/2	B Comunicação Celular: Vias de Transdução de Sinal; Uma Rede de Informações para Atender Condições Fisiológicas e Fisiopatológicas (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	1	1	1			5	C	oncluída
BC5729-7/1	F Fundamentos Básicos da Avaliação do Risco Oferecido por Substâncias Químicas	2	1	6			00	C	oncluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	26
Estágios:			
Total:	0	5	6

Créditos Atribuídos à Dissertação: 1

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/02/2013

Impresso em: 27/06/13 18:42:53

Dados Gerais Formação Atuação Projetos Produções Patentes e Registros Inovação Educação e Popularização de C&T Eventos Orientações Bancas Citações

Fernanda Branco Filippin

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3150176492628451>

Última atualização do currículo em 25/06/2013

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Farmácia pela Universidade do Vale do Itajaí (2010). Atualmente é bolsita de mestrado na Universidade de São Paulo.
(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Fernanda Branco Filippin

Nascime 08/05/1985 - Realeza/PR - Brasil

CPF 051.971.009-66

Formação acadêmica/titulação

2011 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Atividade Melanogênica de Complexos de Platina (II) com Derivados de Hidantoínas como Nova Rota de Citotoxicidade em Melanoma
Orientador: Silvy Stuchi Maria Engler
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2010 - Graduação em Farmácia.
Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI, Itajaí, Brasil
Título: Avaliação da atividade anticolinesterásica do ácido mirsinóico A e do ácido

mirsinóico B, dois compostos isolados da *Rapanea ferruginea*
 Orientador: Cristiani Búerger
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina

Formação complementar

- 2012 - Curso de curta duração em Visão Bioquímica da Melanogênese.
 2012 Associação Brasileira de Cosmetologia, ABC, Sao Paulo, Brasil
- 2008 - Curso de curta duração em Efeitos farmacológicos de plantas.
 2008 XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, SPMB, Brasil
- 2005 - Curso de curta duração em Mastering English Course Level Four.
 2005 Centro de Cultura Anglo Americana, CCAA, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo
 institucional

- 2011 - Vínculo: Bolsista Projeto de Pesquisa , Enquadramento funcional: Bolsista ,
 Atual Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2. Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI

Vínculo
 institucional

- 2008 - Vínculo: Bolsista Projeto de Pesquisa , Enquadramento funcional: Bolsista ,
 2009 Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

Projetos

Projetos
de pesquisa

2011 - Atividade Melanogênica de Complexo de Platina (II) com derivado de
Atual Hidantoína como Nova Rota de Citotoxicidade em Melanoma

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Fernanda Branco Filippin (Responsável);
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2008 - Avaliação da Atividade Anticolinesterásica dos ácidos Mirsinóicos A e B,
2009 isolados da Rapanea Ferruginea

Descrição: Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso, baseado na avaliação da atividade anticolinesterásica dos compostos mirsinóicos A e b, dois compostos isolados da Rapanea ferruginea
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (2);
Integrantes: Fernanda Branco Filippin (Responsável);
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina-FAPESC

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. FILIPPIN, F. B., GAZONI, V. F., YUNES, R.A., SOUZA, M.M., MEYRE-SILVA, C., MALHEIROS, A., BÜRGER, C. Efeito do ácido mirsinóico A sobre a atividade da acetilcolinesterase em estruturas cerebrais de ratos In: VIII Jornada Farmacêutica - VIII CAIQFAR - XXVIII Semana de Iniciação Científica do curso de Farmácia, 2009, Itajaí. VIII Jornada Farmacêutica - VIII CAIQFAR - XXVIII Semana de Iniciação Científica do curso de Farmácia. , 2009.
2. FILIPPIN, F. B., GAZONI, V. F., YUNES, R.A., SOUZA, M.M., MEYRE-SILVA, C., MALHEIROS, A., BÜRGER, C. Efeito do ácido mirsinóico A sobre a atividade da acetilcolinesterase em estruturas cerebrais de ratos In: VII Jornada Farmacêutica VIII CAIQFAR - XXVIII Semana de

Iniciação Científica do curso de Farmácia, 2009, Itajaí.
VIII Jornada Farmacêutica - VIII CAIQFAR - XXVIII Semana de Iniciação Científica do curso de Farmácia, 2009.

3. SANTIN, J.R., KLEIN-JÚNIOR, I.C., COSTA, P., FILIPPIN, F. B., BITTENCOURT, CM.S., BÜRGER, C., BERTÉ, T.E., SOUZA, M.M. Evaluation of anticholinesterasic activity and the effect of taraxerol on scopolamine-induced amnesia In: Reunião de pesquisadores em doença de Alzheimer e desordens relacionadas (VII RPDA), 2009, Porto Alegre. Dementia and neuropsychologia. , 2009. v.3. p.40 - 40
4. FILIPPIN, F. B., GAZONI, V. F., YUNES, R.A., MEYRE-SILVA, C., MALHEIROS, A., SOUZA, M.M., BÜRGER, C. In vitro inhibition of acetylcholinesterase by myrsinoic acid A In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Farmaceutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. Congresso Brasileiro de Farmacologia e Farmaceutica Experimental. , 2009.
5. FILIPPIN, F. B., GAZONI, V. F., MEYRE-SILVA, C., YUNES, R.A., MALHEIROS, A., SOUZA, M.M., BÜRGER, C. vitro inhibition of acetylcholinesterase by myrsinoic acid A In: VII Reunião de pesquisadores em doença de Alzheimer e desordens relacionadas (VII RPDA), 2009, Porto Alegre. Dementia and neuropsychologia. , 2009. v.3. p.41 - 41
6. FILIPPIN, F. B., BÜRGER, C. Avaliação da atividade anticolinesterásica de derivados do ácido benzóico obtidos da Rapanea ferruginea em cérebro e hipocampo de ratos wistar In: VIII seminário de Iniciação Científica, 2008, Itajaí. Livro de resumos do VIII seminário de Iniciação Científica. , 2008. p.156 - 156
7. BÜRGER, C., BERTÉ, T.E., FILIPPIN, F. B., BITTENCOURT, CM.S., SOUZA, M.M. Efeito do taraxerol, um triterpeno isolado da eugenia umbelliflora, sobre a atividade da acetilcolinesterase de cérebro de ratos. In: 4º congresso brasileiro de cérebro, comportamento e emoções, 3º simpósio brasileiro de doenças neurodegenerativas, fórum de discussão em psicofarmacologia, 2º encontro de neuropsiquiatria geriátricae 2º congresso sul brasileiro do sono, 2008, Bento Gonçalves. Programa final do 4º congresso brasileiro de cérebro, comportamento e emoções. , 2008.
8. BERTÉ, T.E., COSTA, P., FILIPPIN, F. B., MEYRE-SILVA, C., SOUZA, M.M., BÜRGER, C. Taraxerol inibe a atiaviade da acetilcolinesterase de cérebro e hipocampo de ratos: um possível efeito anti-alzheimer In: XX simpósio de plantas medicinais do Brasil; X international congress of ethnopharmacology, 2008, São Paulo. Programa do XX simpósio de plantas medicinais do Brasil; X international congress

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. FILIPPIN, F. B., PENNACCHI, P. C.
VII Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular, 2012. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 27/06/2013 às 18:46:59.