UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Avaliação do potencial de superação da quimioresistência do melanoma aos inibidores de BRAF^{V600E} (Vemurafenibe) e de MEK (Trametinibe) utilizando terapia combinatória com 4-nerolidilcatecol (4-NC)

Débora Kristina Alves Fernandes

Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Orientadora:
Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler

Co-orientadora:
Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Avaliação do potencial de superação da quimioresistência do melanoma aos inibidores de BRAF^{V600E} (Vemurafenibe) e de MEK (Trametinibe) utilizando terapia combinatória com 4-nerolidilcatecol (4-NC)

Débora Kristina Alves Fernandes

Versão Original

Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Orientadora:
Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler

Co-orientadora:
Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A363a

Alves-Fernandes, Debora Kristina
Avaliação do potencial de superação da quimioresistência do melanoma aos inibidores de BRAFV600E (Vemurafenibe) e de MEK (Trametinibe) utilizando terapia combinatória com 4-nerolidilcatecol (4-NC) / Debora Kristina Alves-Fernandes. - São Paulo, 2018.
183 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Maria-Engler, Silvya Stuchi
Coorientador: Barros, Silvia Berlanga de Moraes

1. Melanoma. 2. Resistência. 3. 4-NC. 4. Terapia alvo direcionada. I. T. II. Maria-Engler, Silvya Stuchi, orientador. III. Barros, Silvia Berlanga de Moraes, coorientador.

Débora Kristina Alves Fernandes

Avaliação do potencial de superação da quimioresistência do melanoma aos inibidores de BRAF^{V600E} (Vemurafenibe) e de MEK (Trametinibe) utilizando terapia combinatória com 4-nerolidilcatecol (4-NC)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Prof. Dr.
Orientador/presidente

_____
1° examinador

_____
2° examinador

_____
3° examinador

_____
4° examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

À minha querida e amada tia Rosa Magalhães da Costa,

que está na luta contra o câncer

há quase 3 anos e hoje mais do que nunca, é o meu exemplo

de coragem, força e sabedoria.

Mulher guerreira que me ensina todos os dias o que realmente

é importante nesta vida! Te amo tia!

Em memória,

À minha eterna amiga Tamires Castro de Paula que deixou saudades,

mas nada poderá diminuir o amor que você cativou!

Que com seu sorriso exuberante,

nos ensinava que a vida deve ser vivida com intensidade,

mesmo nas horas mais difíceis da sua batalha contra o câncer,

você nos dava força. Você ficará para sempre em nossos corações!

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor nosso **Deus** por tudo, sem Ele nada sou. À nossa Santíssima **mãe Maria**, pela intercessão sempre!

À minha orientadora **Profa. Dra Silvya Stuchi Maria Engler**, por toda ajuda, paciência, ensinamentos e acima de tudo, por ter me ensinado a ser uma pesquisadora e a evoluir todos os dias.

À minha co-orientadora **Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros**, pelo carinho, apoio, ensinamentos e por ter me dado a oportunidade de ingressar neste laboratório que amo tanto.

À minha supervisora do BEPE **Dra. Ashani T. Weeraratna** (*Wistar Institute,* Filadélfia, EUA), pela colaboração e oportunidade de conhecer um novo laboratório, técnicas novas e uma cultura diferente. Este estágio me trouxe uma nova maneira de enxergar o mundo.

Ao meu amor e marido **Denis Martins Fernandes**, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

À minha família, em especial minha mãe **Pedrina Magalhães Alves** e ao meu pai **Marcos Roberto Alves** que dignamente me mostraram o caminho da honestidade e persistência e o valor de ser família.

À minha irmã **Valéria Flávia Alves de Queiroz** e ao meu cunhado **Davidson Queiroz** pelo amor, estímulo, amizade e companheirismo sempre.

À minha grande amiga e parceira **Érica Aparecida de Oliveira**, que me auxilia em tudo e me dá forças em todos os momentos profissionais e pessoais.

À **Fernanda Faião Flores**, amiga e companheira te todas as horas, que mesmo longe me dá suporte em tudo.

À técnica do Laboratório de Biologia da Pele e amiga **Silvia Romano de Assis**, pelo seu apoio, amizade e por aturar todas minhas reclamações sempre sorrindo.

À minha amiga **Manoela Tiago dos Santos**, pela amizade, apoio e maravilhosa hospitalidade durante o período do BEPE realizado na Filadélfia.

Às antigas alunas do Laboratório de Biologia da Pele e eternas amigas **Paula Pennacchi**, **Michelle Garcia Discacciati**, **Bianca Ferruccio**, **Silvana Sandri**, **Thalita Boldrin Zanoni**, **Tatiana Pedrosa**, **Carolina Motter**, **Andréa Fruet** e **Nayane de Souza**, pela ajuda, colaboração e amizade.

Aos novos alunos do Laboratório de Biologia da Pele, **Daniele**, **Stephanie**, **Larissa Carvalho**, **Larissa Sekimoto**, **Luis**, **Michele Bortolucci**, **Vanessa** e **Bárbara**, pelo auxílio e colaboração sempre.

Às minhas novas amigas do laboratório de microambiente tumoral (*Wistar Institute*) **Gretchen Alicea-Rebeca** e **Abibatou Ndoye**, pelo apoio e amizade durante e após o período do BEPE.

Ao pessoal do laboratório de microambiente tumoral do *Wistar Institute*, pela ajuda, receptividade e carinho que me receberam.

À aluna **Araceli Hastreiter** e ao **Prof. Ricardo Fock** do laboratório de Hematologia (FCF/USP) pela colaboração e por todas as análises de sangue periférico e da medula óssea com os experimentos *in vivo*.

Ao Dr. **Aloisio Souza Felipe da Silva** (patologista do Departamento de Patologia e Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do HU/USP), pelas análises histopatológicas e de imunohistoquímica.

Ao **Walter Turato**, técnico dos equipamentos MS FX in vivo PRO e PET Scan, pelas imagens com os experimentos *in vivo* e dos ensaios clonogênicos.

À **Renata Albuquerque**, técnica da FCF/USP, pelas análises de citometria de fluxo.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmácia pela carinho e amizade.

À **Fapesp** pela bolsa regular de doutorado (2014/06959-0) e o BEPE (2017/07010-2) realizado no laboratório de microambiente tumoral no Wistar Institute (Filadélfia, Pensilvânia, Estados Unidos).

"Sem sonhos, as pedras do caminho se tornam montanhas,

os pequenos problemas ficam insuperáveis,

as perdas são insuportáveis,

as decepções se transformam em golpes fatais

e os desafios se transformam em fonte de medo.

Os sonhos trazem saúde para a emoção,

Equipam o frágil para ser autor da sua história,

Renovam as forças do ansioso,

Animam os oprimidos,

Transformam os inseguros em seres humanos de raro valor.

Os sonhos fazem os tímidos terem golpes de ousadia e

Os derrotados serem construtores de oportunidades. "

Augusto Cury

RESUMO

ALVES-FERNANDES, DK. **Avaliação do potencial de superação da quimioresistência do melanoma aos inibidores de BRAF^{V600E} (Vemurafenibe) e de MEK (Trametinibe) utilizando terapia combinatória com 4-nerolidilcatecol (4-NC).** 2018. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Embora o melanoma represente apenas 4% das neoplasias malignas da pele, é considerado a mais grave por ser altamente etal. Em virtude da via MAPK (Mitogen activated protein kinase) estar intimamente ligada ao descontrole da proliferação celular, especialmente em melanoma, esta via se tornou um alvo para o desenvolvimento de terapias direcionadas a oncogenes, como os potentes quimioterápicos Vemurafenibe (inibidor da mutação V600E em BRAF – BRAFV600E) e Trametinibe (inibidor de MEK). Cada vez mais, melhores taxas de respostas vêm sendo alcançadas com os novos medicamentos, porém a maioria dos pacientes está sujeita a recidivas após 7 meses de tratamento devido ao desenvolvimento de quimioresistência, justificando a constante busca por novos compostos terapêuticos. Dados de nosso laboratório indicam que 4-nerolidilcatecol (4-NC) induz aumento na expressão de p53, produção de ROS e dano ao DNA, culminando em apoptose dependente de caspase-3 em células de melanoma por ser um inibidor proteassomal. Além disto, o 4-nerolidilcatecol (4-NC) demonstrou efeito inibitório na proliferação de células de melanoma em modelo de cultura organotípica de pele. Desta forma, este projeto visa avaliar a possibilidade de superação da quimioresistência aos inibidores de BRAF e de MEK, utilizando terapias combinatórias com 4-NC em células de melanoma humano resistentes a estes inibidores. Primeiramente, linhagens celulares de melanoma resistentes aos inibidores de BRAF (R) e BRAF/MEK (DR) foram geradas a partir de células parentais BRAF mutadas (P) e caracterizadas por MTT, microscopia de fluorescência e western blotting. Estas células foram submetidas ao tratamento com 4-NC que apresentou citotoxicidade na concentração de 30µM, inibição de formação de colônias e diminuição na invasão em modelos *in vitro* de culturas 2D e 3D em todas as linhagens estudadas (P, R e DR). O 4-NC foi ainda capaz de induzir estresse de retículo endoplasmático com indução de apoptose. Visando a explorar o efeito terapêutico *in vivo* do 4-NC, outro estudo foi conduzido em animais submetidos a enxerto xenográfico com células parentais de melanoma NRAS mutadas. Após desenvolvimento do tumor, os animais foram tratados 3 vezes por semana durante 3 semanas com 4-NC (10 mg/kg) por via i.p. O 4-NC foi capaz de inibir em até 4 vezes o crescimento dos tumores xenográficos (4/10) quando comparado com os controles, com remissão completa do tumor em um animal. A expressão de p53 e PARP clivada foi aumentada nos tumores dos animais tratados, sugerindo apoptose. A expressão gênica de MMP2 e MMP14 estava diminuída nas mesmas amostras, demonstrando o papel do 4-NC na inibição da invasão do melanoma *in vivo*. Finalmente, a toxicidade sistêmica do 4-NC foi avaliada nas mesmas doses empregadas no ensaio *in vivo* de tumorigênese. A baixa toxicidade observada nos ensaios toxicológicos com tratamentos sub-crônicos com 4-NC e a citotoxicidade demonstrada em modelos xenográficos nos leva a considerar este composto como promissor para estudos futuros e sua aplicação no tratamento do melanoma cutâneo humano, incluindo pacientes resistentes aos inibidores de BRAF e MEK.

Palavras-chave: Melanoma. Resistência. Terapia alvo direcionada. 4-NC.

ABSTRACT

ALVES-FERNANDES, DK. **Evaluation of the potential of overcoming the chemoresistance of melanoma to BRAF^{V600E} (Vemurafenib) and MEK (Trametinib) inhibitors using combinatory therapy with 4-nerolidylcatechol (4-NC).** 2018. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Melanoma accounts for only 4% of malignant neoplasms of the skin, but is considered the most serious because it is highly deadly. Because the MAPK (Mitogen activated protein kinase) pathway is closely linked to the lack of control of cell proliferation, especially in melanoma, this pathway has become a target for the development of oncogene-targeted therapies, such as the potent chemotherapeutic agents Vemurafenib (V600E mutation inhibitor in BRAF - BRAF^{V600E}) and Trametinib (MEK inhibitor). Increasingly, better response rates have been achieved with the new drugs, but most patients are subject to relapses after 7 months of treatment due to several mechanisms, which justify the constant search for new therapeutic compounds. Data from our laboratory indicate that 4-nerolidylcatechol (4-NC) induces increased p53 expression, ROS production and DNA damage, culminating in caspase-3 dependent apoptosis in melanoma cells. The 4-NC compound demonstrated an inhibitory effect on melanoma cell proliferation in an organotypic skin culture model. Thus, this project aims to evaluate the possibility of overcoming the existing chemoresistance to BRAF and MEK inhibitors, using 4-NC combinatory therapies in human melanoma cells resistant to these inhibitors. Firstly, melanoma cell lines resistant to BRAF (R) and BRAF / MEK (DR) inhibitors were generated from naive cells mutated BRAF (N) and characterized by MTT, fluorescence microscopy and western blotting. These cells were submitted to 4-NC treatment that showed cytotoxicity with 30 µM, inhibition of colony formation and decrease in invasion in 2D and 3D *in vitro* models in all cell line studied (N, R and DR). Furthermore, 4-NC was able to induce endoplasmic reticulum stress with apoptosis induction. In order to explore the *in vivo* therapeutic effect of 4-NC, an additional study was conducted using xenograft model with NRAS-mutated melanoma cell line. After tumor development, the animals were treated 3 times per week for 3 weeks with 4-NC (10 mg / kg) by i.p. injection. 4-NC was able to inhibit up to 4-fold the growth of xenograft tumors (4/10) when compared to controls, with complete tumor remission in one animal. Cleaved PARP and p53 expression were increased in the tumors of treated animals, suggesting apoptosis. MMP2 and MMP14 gene expression were decreased in the same samples, demonstrating the role of 4-NC in inhibiting melanoma invasion *in vivo*. Finally, the systemic toxicity of 4-NC was evaluated at the same doses employed in the *in vivo* tumorigenesis assay. The low toxicity observed in the toxicological assays with sub-chronic 4-NC treatments and the demonstrated cytotoxicity in xenograft models leads us to consider this compound as promising for future studies and its application in the treatment of cutaneous human melanoma, including patients resistants to BRAF and MEK inhibitors.

Keywords: Melanoma. Resistance. Targeted target therapy. 4-NC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios de desenvolvimento do melanoma.....024

Figura 2. Vias de resistência ao Vemurafenibe.....031

Figura 3. Estrutura do 4-nerolidilcatecol (4-NC) 037

Figura 4. Esquema da geração das linhagens duplo-resistentes a partir de linhagens resistentes.....040

Figura 5. Esquema da geração das linhagens duplo-resistentes a partir de linhagens parentais.....041

Figura 6. Geração da dupla-resistência da linhagem SK-MEL-28.....060

Figura 7. Comparação da morfologia entre as diferentes linhagens SK-MEL-28 P, SK-MEL-28 R e SK-MEL-28 DR.....060

Figura 8. Demonstração de alteração morfológica da linhagem SK-MEL-28 tratada com os inibidores de BRAF.....060

Figura 9. Fotomicrografia da linhagem SK-MEL-28 DR gerada pelo projeto.....061

Figura 10. Comparação da morfologia entre as diferentes linhagens de SK-MEL-19 P, R e DR.....061

Figura 11. Geração da dupla-resistência da linhagem SK-MEL-19.....062

Figura 12. Demonstração da sensibilidade da linhagem SK-MEL-19 na geração da dupla-resistência.....062

Figura 13. Fotomicrografia da linhagem SK-MEL-19 DR gerada pelo projeto.....063

Figura 14. Comparação da morfologia entre as diferentes linhagens SK-MEL-29 (P, R e DR) 063

Figura 15. Fotomicrografia da linhagem SK-MEL-29 DR gerada pelo projeto.....064

Figura 16. Geração da dupla-resistência da linhagem SK-MEL-29.....064

Figura 17. Demonstração da diferença na produção de melanina entre as linhagens SK-MEL-29 (P, R e DR).....064

Figura 18. Viabilidade comparada entre as células resistentes e duplo-resistentes.....065

Figura 19. Viabilidade comparada entre as linhagens SK-MEL-28 resistentes e duplo-resistentes.....066

Figura 20. Expressão proteica de EGFR total e EGFR fosforilado nas linhagens do **e**studo.....067

Figura 21. Caracterização da expressão proteica dos marcadores d via MAPK nas linhagens do estudo.....068

Figura 22. Expressão proteica dos principais marcadores da via MAPK nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 P, R e DR.....069

Figura 23. Visualização dos pellets celulares da linhagem SK-MEL-29 P no momento da extração de proteínas para o ensaio de western blotting.....071

Figura 24. Expressão proteica dos marcadores p-ERK e ERKt nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 P, R e DR.....071

Figura 25. Expressão proteica do marcador p-ERK nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 P, R e DR.....072

Figura 26. Expressão proteica do marcador p-ERK nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 P, R e DR.....073

Figura 27. Caracterização da expressão proteica dos marcadores da via MAPK nas linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29 P, R e DR.....074

Figura 28. Processo de geração da dupla-resistência das linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29.....076

Figura 29. Processo de geração da dupla-resistência das linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29.....077

Figura 30. Caracterização microscópica da morfologia diferencial entre as linhagens SK-MEL-28 P, R e DR.....078

Figura 31. Confirmação da dupla-resistência da linhagem SK-MEL-28 DR.....079

Figura 32. Caracterização da expressão proteica dos marcadores da via MAPK nas linhagens SK-MEL-28 P, R e DR.....080

Figura 33. Efeitos citotóxicos de 4-NC em linhagens SK-MEL-19, SK-MEL-29 e SK-MEL-28 P, R e DR.....082

Figura 34. Efeitos citotóxicos de 4-NC na viabilidade da linhagem SK-MEL-19 P e R.....084

Figura 35. Efeitos citotóxicos de 4-NC na viabilidade da linhagem SK-MEL-29 P e R.....085

Figura 36. Efeitos citotóxicos de 4-NC na viabilidade da linhagem SK-MEL-28 P e R.....086

Figura 37. Efeitos citotóxicos de 4-NC na viabilidade da linhagem SK-MEL-28 DR.....087

Figura 38. Potencial de inibição na formação de colônias do 4-NC ou tratamento combinado nas linhagens do estudo.....088

Figura 39. Efeito inibitório do tratamento e avaliação da citotoxicidade em células endoteliais t.END.1.....090

Figura 40. Potencial de inibição na migração celular da linhagem SK-MEL-28 P tratada com 4-NC.....092

Figura 41. Potencial de inibição na migração celular da linhagem SK-MEL-28 R tratada com 4-NC + vemurafenibe.....092

Figura 42. Potencial de inibição na migração celular da linhagem SK-MEL-28 P tratada com menores concentrações de 4-NC e diminuição de SFB.....093

Figura 43. Potencial de inibição na migração celular da linhagem SK-MEL-28 R tratada com menores concentrações de 4-NC (+ vemurafenibe) e diminuição de SFB.....093

Figura 44. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na invasão das linhagens SK-MEL-28 R e DR.....095

Figura 45. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na invasão das linhagens SK-MEL-28 P, R e DR.....096

Figura 46. Demonstração de diminuição da invasão no tratamento com 4-NC na invasão das linhagens SK-MEL-28 P, R e DR.....097

Figura 47. Indução de apoptose na linhagem SK-MEL-29 R com 4-NC em tratamento combinado.....098

Figura 48. Indução de apoptose na linhagem SK-MEL-28 R com 4-NC em tratamento combinado.....099

Figura 49. Indução de apoptose na linhagem SK-MEL-28DR com 4-NC em tratamento combinado.....099

Figura 50. Indução de necrose na linhagem SK-MEL-19 R com 4-NC em tratamento combinado.....100

Figura 51. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na expressão das principais proteínas da resposta UPR.....102

Figura 52. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na expressão de ATF-6.....102

Figura 53. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na expressão da via de IRE1.....103

Figura 54. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na expressão da via de PERK.....103

Figura 55. Silenciamento de CHOP (shCHOP) nas linhagens SK-MEL-28 P, R e DR.....104

Figura 56. Porcentagem de apoptose em linhagens SK-MEL-28 P, R e DR CHOP silenciadas após tratamento com 4-NC.....105

Figura 57. Potencial inibitório em modelos xenográficos tratados com 4-NC.....108

Figura 58. Volume tumoral de animais tratados com 10 mg/kg de 4-NC i.p. por semana.....108

Figura 59. Peso corpóreo dos animais e consumo de ração de cada grupo medido nos dias de tratamento intraperitoneal (9 doses) de 10mg/Kg de 4-NC.....108

Figura 60. Diferenças tumorais entre os animais do grupo controle e tratado com 4-NC no ensaio xenográfico.....109

Figura 61. Expressão de mRNA de MMP2, MMP9 e MMP14 observada nos tumores dos animais dos diferentes grupos experimentais.....111

Figura 62. Expressão proteica do marcador p53 e PARP detectada nos tumores dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.....111

Figura 63. Potencial inibitório em modelos xenográficos tratados com 4-NC por via subcutânea.....112

Figura 64. Radiografias digitais e imagens fluorescentes em modelos xenográficos tratados com 4-NC.....113

Figura 65. Ausência de nódulos tumorais e caquexia em ensaio piloto xenográficos inoculados com células de melanoma resistente SK-MEL-29 R.....115

Figura 66. Presença de manchas escuras nos pulmões dos animais submetidos ao ensaio piloto xenográfico com células de melanoma resistentes.....116

Figura 67. Fotomicrografia indicando presença de células marcadas (anti-melanoma) nos pulmões dos animais submetidos ao ensaio piloto xenográfico com células de melanoma resistentes.....116

Figura 68. Fotomicrografias indicando a presença de células marcadas inespecíficamente (anti-Melan-A) nos pulmões dos animais do ensaio xenográfico com células SK-MEL-28 R.....117

Figura 69. Fotomicrografias do fígado e cérebro dos animais do ensaio xenográfico com células SK-MEL-28 R indicando a presença de células marcadas inespecificamente (anti-Melan-A).....118

Figura 70. Análise do peso corpóreo dos animais no dia da eutanásia.....120

Figura 71. Pesagem dos órgãos dos animais do ensaio toxicológico no dia eutanásia.....120

Figura 72. Análise histopatológica dos pulmões, rins, fígado e cérebro no dia da eutanásia.....121

Figura 73. Fotomicrografias representativas do cérebro dos animais NT e 4-NC demonstrando a presença de núcleo picnóticos.....121

Figura 74. Fotomicrografias representativas do fígado dos animais do ensaio toxicológico demonstrando a presença de edema celular.....122

Figura 75. Análise de parâmetros bioquímicos no sangue de todos animais do ensaio toxicológico.....124

Figura 76. Contagem de células progenitoras da medula óssea por citometria de fluxo…...125

Figura 77. Contagem de células presentes na medula óssea dos animais por citometria de fluxo.....126

Figura 78. Viabilidade dos Linfócitos T e B presentes na medula óssea.....127

Figura 79. Contagem de plaquetas presentes nos animais após o ensaio toxicológico.....127

Figura 80. Parâmetros hematológicos (série vermelha) dos animais ao final do ensaio toxicológico.....128

Figura 81. Contagem do número absoluto (Abs) de leucócitos e suas diferentes populações (neutrófilos, linfócitos e monócitos) em sangue periférico dos animais ao final do ensaio toxicológico.....128

Figura 82. Contagem dos diferentes tipos celulares da medula óssea (Blastos, Megacariócitos, Monócitos, Linfócitos, Granulócitos jovens e maduros e Eritrócitos jovens e maduros)* dos animais ao final do ensaio toxicológico.....129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados no ensaio de western blotting para a confirmação da resistência das linhagens utilizadas.....043

Tabela 2. Anticorpos utilizados no ensaio de western blotting para a investigação do mecanismo de ação da citotoxicidade do 4-NC.....048

Tabela 3. Painel de anticorpos para caracterização imunofenotípica das MNC.....053

Tabela 4. Estratégia de análise das populações de interesse por citometria de fluxo.....054

Tabela 5. *Primers* utilizados no ensaio RT-PCR em tempo real.....057

Tabela 6. Peso corpóreo dos animais observados após a administração de 4-NC.....106

Tabela 7. Peso corpóreo e peso dos órgãos dos animais observados no momento da necropsia.....106

Tabela 8. Observações macroscópicas realizadas no momento da necropsia dos animais submetidos ao experimento tumorigênico com tratamento intraperitoneal.....110

Tabela 9. Avaliação das Células Tronco Hematopoéticas (CTH) (%).....114

Tabela 10. Análise de hemograma obtido a partir do sangue total.....114

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A1. Curva de crescimento das linhagens SK-MEL-19 P, SK-MEL-19R e SK-MEL-19 DR em três confluências diferentes nos períodos de 24, 48, 72 e 96h.....162

APÊNDICE A2. Curva de crescimento das linhagens SK-MEL-29 P, SK-MEL-29R e SK-MEL-29 DR em três confluências diferentes nos períodos de 24, 48, 72 e 96h.....163

APÊNDICE A3. Viabilidade das linhagens SK-MEL-19 P, SK-MEL-19 R e SK-MEL-19 DR com o ensaio de exclusão do azul de tripan em três confluências diferentes nos períodos de 24, 48, 72 e 96h.....164

APÊNDICE A4. Viabilidade das linhagens SK-MEL-29 P, SK-MEL-29 R e SK-MEL-29 DR com o ensaio de exclusão do azul de tripan em três confluências diferentes nos períodos de 24, 48, 72 e 96h.....165

APÊNDICE A5. Fotografias das linhagens SK-MEL-19 P, SK-MEL-19 R, SK-MEL-19 DR, SK-MEL-29 P, SK-MEL-29 R e SK-MEL-29 DR em três confluências diferentes obtidas durante o experimento de curva de crescimento com o ensaio de exclusão de azul de tripan após o período de 24, 48, 72 e 96h.....166

APÊNDICE A6. Tabela da pesagem dos animais e dos órgãos no dia da eutanásia.....169

APÊNDICE A7. Tabela da contagem de diferentes células da medula óssea por citometria de fluxo.....170

APÊNDICE A8. Tabela da contagem de diferentes células da medula óssea por mielograma.....171

APÊNDICE A9. Tabela da contagem dos parâmetros hematológicos.....172

APÊNDICE A10. Tabela de análise das enzimas de bioquímica clínica.....173

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Parecer da Comissão de Ética no Uso Animais.....175

ANEXO B. Currículo Lattes.....178

ANEXO C. Ficha do Aluno.....181

LISTA DE SIGLAS

4-NC - Nerolidilcatecol

AST/ALT - Aspartato aminotransferase/Alanina aminotransferase

ATF-3 - *Cyclic AMP-dependent transcription factor*

ATF-4t/p-ATF-4 - *Total* and *phosphorylated Activating transcription factor 4*

ATF-6 - *activating transcription factor-6*

BH3 - *Bcl-2 homologous 3*

BIM - *Bcl-2-like protein 11*

Bim-EL - *Bim-extra long*

BiP - *Binding immunoglobulin protein*

BMF - *Bcl-2 modifying factor*

BRAFi/MEKi – Inibidores de BRAF e de MEK

CDK4 - *cyclin-dependent kinase 4*

CDKN2A - *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CHOP/GADD153 - CCAAT-*enhancer-binding protein homologous protein*

CMP - Progenitora Mielóide Comum

CTH - Células Tronco Hematopoéticas

CTLA-4 - *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DR – Linhagem de melanoma duplo-resistente

DTIC - Dacarbazina

DTPs - *drug tolerant persisters*

EGFR - *Epidermal growth factor receptor*

eIF2a - *eukaryotic initiation factor α2*

ERK1/2 - *extracellular signal–regulated kinases*

Ero1-a - *ER oxidoreductin 1 alpha*

FDA – *U.S. Food and Drug Adminstration*

GADD34 - *phosphatase growth arrest and DNA damage inducible gene 34*

GLI1/GLI2 - Glioma-*associated oncogene homolog 1 and 2*

GMP - Progenitoras Granulócitos e Monócitos

HERPUD1 - *Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein*

HP - Progenitoras Hematopoéticas

HSP90 - *Heat Shock Protein 90*

IC_{50} – Concentração inibitória de 50% da atividade

IDTC - *induced drug-tolerant*

IL-2 – Interleucina-2

IRE1t/p-IRE1 - *Total* and *phosphorylated phospho-inositol requiring enzyme 1*

MAPK - *mitogen-activated protein kinase*

MAPK3P38/Cot1 - *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8*

Mcl-1 - *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*

MEC - matriz extracelular

MEK - *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*

MEP - Progenitoras Eritróide e Megacariótico

MITF - *Microphthalmia-associated transcription factor*

MMP - metaloproteinases de matriz

mTOR - *mammalian target of rapamycin*

MYC - gene regulador do oncocgene *c-Myc*

NF1- *neurofibromin-1*

NF-κB - *factor nuclear kappa B*

NIH - *U.S. National Library of Medicine*

NT – Não tratado

OECD/OCDE - *Organization for Economic Co-operation and Development*

P – Linhagem de melanoma parental

p53 – *tumor protein 53*

PARP - *Poly (ADP-ribose) polymerase*

PD-1 - *programed death 1* / **PD-L1 /PD-L2** - ligantes de PD-1

PDGFRβ - *Plaleted-derived growth factor receptor β*

PDI - *Protein disulfide isomerase*

PERKt/p-PERK - *Total* and *phosphorylated protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*

PI3K - *lipid kinase phosphoinositide-3 kinase*

PL - Progenitoras Linfóides

PLX4032 – Vemurafenibe

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*

R – Linhagem de melanoma resistente

RAF - *Serine/threonine-protein kinase* (ARAF, BRAF e CRAF)

RAS - *RAS subfamily* (N-RAS, H-RAS e K-RAS)

RE - Retículo Endoplasmático

RTK - *receptor tirosina kinase*

SFB - Soro Fetal Bovino

shRNA –*short harpin RNA*

TERT - *telomerase reverse transcriptase*

TP53 – gene da *Tumor protein p53*

TRA – Trametinibe

UPR – *Unfolded Protein Response*

UPS - Sistema ubiquitina-proteassoma

V600E – troca do aminoácido valina por ácido glutâmico no códon 600

V600K/D/R - troca do aminoácido valina por lisina (K), ácido aspártico (D) ou arginina (R) no códon 600

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23

1.1 Melanoma 23

1.2 Via de sinalização MAPK 25

1.3 Tratamentos utilizados e quimioresistência 27

1.3.1 Quimioterapias convencionais e imunoterapias 29

1.3.2 Principais terapias alvo direcionadas 30

1.3.2.1 Inibidores de BRAF 30

1.3.2.2 Novas possibilidades terapêuticas: Inibidores de MEK, ERK e AKT 32

1.4 Inibidores proteassomais 35

1.4.1 Nerolidilcatecol (4-NC), um inibidor proteassomal 20S 36

2. JUSTIFICATIVA 37

3. OBJETIVOS 38

4. MATERIAIS E MÉTODOS 39

4.1 Ensaios *in vitro* 39

4.1.1 Cultura celular 39

4.1.2 Manutenção das culturas celulares 39

4.1.3 Geração da plataforma de células de melanoma humano duplo-resistentes aos inibidores B-RAF/MEK Geração da plataforma 39

4.1.4 Ensaios de confirmação da resistência das células de melanoma humano aos inibidores de BRAF e MEK 41

4.1.4.1 Ensaio de imunofluorescência 41

4.1.4.2 Avaliação da viabilidade celular por MTT 42

4.1.4.3 Caracterização da resistência alcançada nas linhagens celulares por Western Blotting 42

4.1.5 Avaliação da citotoxicidade com o tratamento combinado contendo 4-NC 43

4.1.5.1 Tratamentos utilizados nos ensaios 43

4.1.5.1.1 Preparação e isolamento do 4-NC 43

4.1.5.2 Curva de crescimento – Ensaio de Exclusão do Azul de Tripan 44

4.1.5.3 Ensaio de viabilidade celular 44

4.1.5.4 Avaliação do potencial do tratamento combinado na formação de colônias pelo Ensaio Clonogênico 45

4.1.5.5 Avaliação do potencial do tratamento combinado na migração celular (“Ensaio de ferida”) 45

4.1.5.6 Avaliação do potencial do tratamento combinado na invasão celular (“transwell”) 46
4.1.5.7 Ensaio de esferoides 3D.....46
4.1.5.8 Avaliação do potencial do tratamento com 4-NC em ensaio de angiogênese 47
4.1.5.9 Investigação de morte celular gerada com o tratamento combinado (Citometria de Fluxo”) 47
4.1.5.10 Investigação do mecanismo de morte gerada com o 4-NC em uso isolado ou em tratamento combinado 48
4.1.5.10.1 Western blotting..... 48
4.1.5.10.2 Manipulação de genes para silenciamento através de shRNA 49
4.1.5.10.3 Ensaio de exclusão do azul de tripan..... 49
4.2 Ensaios *in vivo* 50
4.2.1 Camundongos 50
4.2.2 Ensaios Toxicológicos 50
4.2.2.1 Ensaio Toxicológico – Agudo (5 e 10 mg/kg – i.p.) 50
4.2.2.2 Ensaio Toxicológico – Doses repetidas (10 mg/kg – s.c.) 51
4.2.2.2.1 Histopatologia dos tecidos 51
4.2.2.2.2 Hemograma..... 51
4.2.2.2.3 Obtenção de células da medula óssea 52
4.2.2.2.4 Contagem de TNC da MO 52
4.2.2.2.5 Avaliação das populações de células hematopoéticas da MO por citometria de fluxo 52
4.2.2.2.6 Análises bioquímicas no sangue 54
4.2.3 Ensaios tumorigênicos 55
4.2.3.1 Ensaio Tumorigênico – Tratamento i.p. (10 mg/kg) 55
4.2.3.1.1 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real dos tumores..... 56
4.2.3.1.1.1 Extração do RNA total..... 56
4.2.3.1.1.2 RT-PCR em tempo real..... 56
4.2.3.1.2 Análise de expressão proteica dos tumores..... 57
4.2.3.2 Ensaio Tumorigênico – Tratamento s.c. (10 mg/kg)..... 57
4.2.3.3 Ensaio Tumorigênico – Inoculação das células resistentes – Tratamento s.c. (10 mg/kg) 58
4.3 Análise estatística..... 58

5. RESULTADOS 59

5.1 Ensaios *in vitro* 59
5.1.1 Geração e caracterização da plataforma de células de melanoma humano duplo-resistentes aos inibidores B-RAF/MEK a partir de linhagens resistentes..... 59

5.1.2 Geração e caracterização da plataforma de células de melanoma humano duplo-resistentes aos inibidores B-RAF/MEK a partir de linhagens parentais 75

5.1.3 Avaliação da citotoxicidade com a terapia combinatória e/ou 4-NC..... 80

5.1.3.1 Avaliação da citotoxicidade utilizando 4-NC em linhagens parentais ou tratamento combinado em resistentes e duplo-resistentes 80

5.1.3.2 Investigação de efeito citotóxico na formação de tubos (Ensaio de Angiogênese) 89

5.1.3.3 Avaliação do potencial do tratamento combinado na migração celular ("Ensaio de ferida") 90

5.1.3.4 Avaliação do potencial do tratamento combinado na invasão celular em modelos 2D (Câmara de Boyden - Transwell) 94

5.1.3.5 Avaliação do potencial do tratamento combinado na invasão celular em modelos 3D (Esferóides) 95

5.1.3.6 Investigação de morte celular induzida pelos tratamentos combinados por citometria de fluxo..... 97

5.1.3.7 Investigação do mecanismo de ação dos tratamentos combinados através da detecção de níveis proteicos por western blottng..... 100

5.2 Ensaios *in vivo*..... 105

5.2.1 Ensaio Toxicológico – Agudo (5 e 10 mg/kg – i.p.) 105

5.2.2 Ensaio Tumorigênico – Tratamento i.p. (10 mg/kg) 107

5.2.3 Ensaio Tumorigênico – Tratamento s.c. (10 mg/kg)..... 111

5.2.4 Ensaio Tumorigênico para células resistentes..... 114

5.2.5 Ensaio Toxicológico para avaliação da administração do 4-NC (10 mg/kg) por via s.c. 119

6. DISCUSSÃO 130

7. CONCLUSÕES 144

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 146

APÊNDICE 162

ANEXOS 175

1. INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

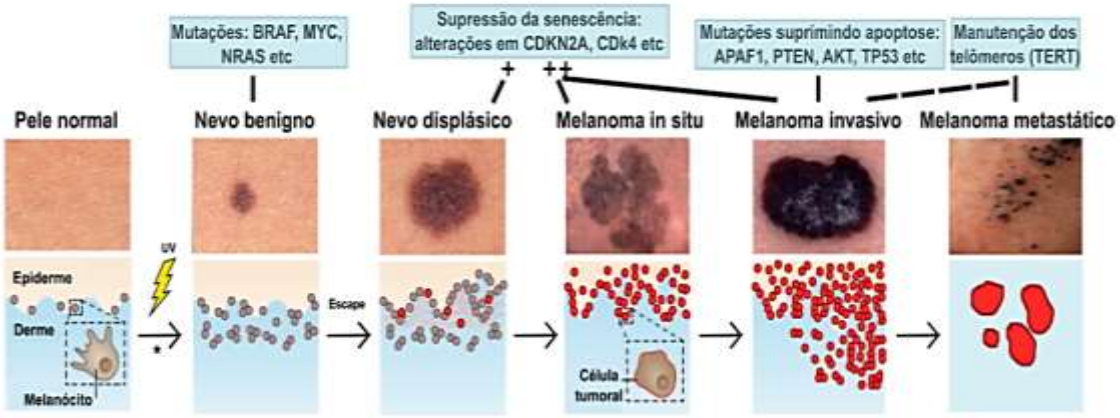
O câncer é a principal causa de mortes por todo o mundo. Dentre os diversos tipos de câncer, o melanoma cutâneo representa apenas 3% das neoplasias malignas da pele, porém é considerado o mais grave devido à alta possibilidade de metástases (INCA, 2018). Anualmente, há cerca de 50.000 mortes ao redor do mundo e esta incidência continua aumentando (SLIPICEVIC & HERLYN, 2012). Em 2013, o número de mortes no Brasil foi de 1547 pessoas, sendo 903 homens e 644 mulheres, e a estimativa de novos casos para 2018 é de 6.260 casos, sendo 2.920 homens e 3.340 mulheres (INCA, 2018). A estimativa para 2018 nos Estados Unidos é ainda mais preocupante com 91.270 novos casos e 9.320 mortes estimadas em ambos os sexos (SIEGEL, MILLER & JEMAL, 2018). Se o tumor é detectado no início, antes da invasão à derme, a excisão cirúrgica promove a cura em aproximadamente 99% dos pacientes, porém a taxa de sobrevida de 5 anos cai para 15% e para uma sobrevida média de 1 ano para aqueles casos com a doença disseminada e avançada (SLIPICEVIC & HERLYN, 2012).

Embora os melanócitos representem minoria celular na epiderme, eles possuem a função de produzir melanina para proteção dos queratinócitos (maioria celular) contra os danos causados por radiação UV (SHAIN & BASTIAN, 2016). O desenvolvimento e progressão do melanoma dependem de um conjunto de mutações genéticas que permitem aos melanócitos, através do escape da regulação por contato dos queratinócitos, a migrarem, invadirem e sobreviverem em um novo microambiente. Estas mutações são chamadas de condutoras ou "*drivers*" das doenças, mas as células também requerem muitas outras alterações secundárias ou "passageiras" como resultado da instabilidade genômica, que é particularmente vista em células de melanoma (SLIPICEVIC & HERLYN, 2012).

Clarck et al., (1984) demonstraram que o desenvolvimento do melanoma ocorre em seis passos, onde primeiramente ocorre o aparecimento de um *nevus* melanocítico comum (lesão neoplásica benigna), ou seja, estruturalmente normal. Estes nevos geralmente surgem nas primeiras duas décadas de vida e apresentam tendência a regressão após a sexta década (ZALAUDEK et al., 2011). Porém, devido à hiperplasia melanocítica, ocorre sua diferenciação aberrante, prosseguida de atipias nucleares e displasias melanocíticas. Os nevos displásicos demonstram

maior carga mutacional do que os nevos comuns. Diferentes mutações podem ser pré-existentes [*telomerase reverse transcriptase* (TERT) e *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A)] ou adquiridas [gene da *tumor protein p53* (TP53), *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN), etc] permitindo que o tumor alcance um estágio histopatológico mais avançado, uma vez que uma mutação indutora de proliferação ocorra [*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog* (NRAS), *Serine/threonine-protein kinase B-raf* (BRAF) e *neurofibromin-1* (NF1)] Como resultado observa-se um crescimento radial na epiderme, caracterizando uma lesão organizacional assimétrica de bordas irregulares (melanoma *in situ*). As lesões podem avançar com o crescimento vertical, fase denominada de invasão dérmica, onde as células de melanoma penetram no tecido mesenquimal adjacente caracterizando o melanoma invasivo. O risco da fase metastática e morte correlaciona com a profundidade da invasão sendo caracterizada por disseminação das células do local primário para colonização em outros tecidos (CLARCK, et al., 1984; IBRAHIM, HALUSKA, 2009; SHAIN & BASTIAN, 2016) (Figura 1).

Figura 1. Estágios de desenvolvimento do melanoma



Fonte: Figura modificada de SHAIN & BASTIAN, 2016.

Tanto na progressão tumoral quanto no processo de metástases o microambiente tumoral tem um importante e essencial papel na indução de um ambiente favorável para as células tumorais, sendo pela presença de células tronco tumorais (são formadas a partir de células tronco normais do tecido passando por transformação oncogênica), células endoteliais (auxiliando na construção de novos vasos sanguíneos e linfáticos associados ao tumor favorecendo o crescimento tumoral e metástases), células imune inflamatórias (leucócitos podem ser

antagonistas ou promotores tumorais) ou fibroblastos associados ao tumor (miofibroblastos caracterizados por expressão do marcador α-SMA que podem secretar uma variedade de componentes da matrix extracelular) envolvidos nos processos de proliferação, angiogênese, invasão e metástases das células tumorais (HANAHAN & WEINBERG, 2011). É descrito que as células de melanoma no tumor primário ou em foco micrometastático podem se manter “dormente” por períodos que variam de meses a décadas e depende de três elementos principais: 1) dormência celular, ao qual as células sobrevivem em um estado quiescente se dividindo lentamente; 2) dormência angiogênica, pela falta de vascularização mantém o crescimento de micrometástases e promove apoptose, e 3) dormência mediada pelo sistema imune que limita a população tumoral. A interrupção destes processos pode estimular a expansão das células tumorais em metástases evidentes (MERLINO et al., 2016). Durante o processo metastático as células oriundas do tumor primário sofrem uma série de modificações na morfologia, na síntese de fatores de crescimento, proteases e fatores angiogênicos (DIPIRO et al., 2005; KUMAR, *et* al, 2008). Como exemplo, a exacerbação na produção e o aumento da atividade das metaloproteinases de matriz (MMP) têm sido considerados eventos primordiais aos processos de invasão e metástase de tumores de melanoma, pois interferem na degradação da matriz extracelular (MEC) e na sinalização intracelular (BROHEM et al*.,* 2009).

1.2 Via de sinalização MAPK (*Mitogen activated protein kinase*)

Sabe-se que aproximadamente 50% dos melanomas possuem mutação em BRAF (DAVIES et al., 2002; MALDONADO et al., 2003*;* SOLIT, ROSEN, 2011; CHAPMAN, et al., 2011). Além disso, mais de 95% das mutações em BRAF afetam a troca do aminoácido valina (V) por um ácido glutâmico (E) no códon 600 ($BRAF^{V600E}$). Outras mutações identificadas em melanoma são as variantes V600K (troca por lisina) e V600D/R (troca por ácido aspártico - D ou arginina - R), mas em proporções muito menores (FEDORENKO, PARAISO, SMALLEY, 2011). A mutação em NRAS é a segunda mais observada (15-25%) nos melanomas cutâneos (BALL et al., 1994; CURTIN et al., 2005; VAN'T VEER et al. ,1989). Um recente trabalho descreveu um perfil de alterações genômicas em melanomas cutâneos em análises baseadas em nível de RNA, DNA e proteico de pacientes, foi estabelecida uma

classificação em quatro subgrupos baseada no padrão de alta prevalência de genes mutados, sendo elas BRAF (52% das amostras), NRAS (28%), NF1 (14%) ou triplo-selvagem (6% - triple *wild-type*) demonstrando a importância da via MAPK (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015). NF1 nestas amostras apresentou perda de função (loss-of-function – LoF) em controlar a atividade de RAS, e desta forma, ativando a via de sinalização canônica MAPK (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015). Porém, outras moléculas também podem estar alteradas como é o caso da perda de atividade dos genes supressores de tumor (como p53 e PTEN), fatores de transcrição [*Microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) e gene regulador do oncocgene *c-Myc* (MYC) ou ainda alterações em outros fatores envolvidos com crescimento e metabolismo (como por exemplo, os genes KIT e AKT) ou ainda com vida útil replicativa (TERT) (FLAHERTY, HODI, FISHER, 2012; SHAIN & BASTIAN, 2016). Mutações em CDKN2, *cyclin-dependent kinase 4* (CDK4) e TERT têm sido apontadas como os prováveis genes que predispõe ao aparecimento do melanoma (DIPIRO et al., 2005; IBRAHIM, HALUSKA, 2009; REZZE, LEON, DUPRAT, 2010; SHAIN & BASTIAN, 2016).

Por ser a mais prevalente, a via *mitogen-activated protein kinase* **(**MAPK) é considerada a mais importante na biologia do melanoma. RAS está envolvida na regulação da ativação de *extracellular signal–regulated kinases* (ERK1/2) induzido pelo *receptor tirosina kinase* (RTK). A sinalização é iniciada através do recrutamento de RAF para a membrana plasmática pelo RAS ativado. Por sua vez, RAF ativa *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MEK) e ERK1/2 (Figura 2). ERK ativado pode se deslocar para o núcleo, onde fosforila e regula vários fatores de transcrição levando a expressão de diversos genes (ROBERTS, DER, 2007), levando à proliferação celular. Adicionalmente, RAS se liga e ativa *lipid kinase phosphoinositide-3 kinase* (PI3K) ativando a via AKT e prevenindo a apoptose (IBRAHIM, HALUSKA, 2009).

BRAF é uma serina trenina quinase da família das RAF quinases (ARAF, BRAF e CRAF). Diferentemente de ARAF e CRAF, BRAF necessita apenas da fosforilação por RAS para ser ativado, o que pode aumentar a suscetibilidade aos eventos mutacionais carcinogênicos (IBRAHIM, HALUSKA, 2009). A aquisição da mutação V600E (90% das mutações BRAF) desestabiliza a conformação inativa da BRAF quinase, tornado-a constitutivamente ativa, o que leva ao descontrole da proliferação celular (via regulação de ciclina D1), bem como a imortalização dessas

células através da supressão de apoptose (regulação negativa de *Bcl-2-like protein 11* [BIM] e *Bcl-2 modifying factor* [BMF]), além do aumento da motilidade celular e invasão (modificação do citoesqueleto, expressão de integrinas e expressão de metaloproteinases) (KUDCHADKAR, PARAISO, SMALLEY, 2012; GIBNEY et al., 2013). As mutações em BRAF (por exemplo, a V600E) fazem com que a proteína medeie a cascata de ativação RAF/MEK/ERK1/2 (via de MAPK) independente de RAS (GIBNEY et al., 2013).

1.3 Tratamentos utilizados e quimioresistência

A resistência terapêutica na era do sequenciamento de células individuais favoreceu a descoberta de mutações somáticas recorrentes em genes codificadores de proteínas em muitos pacientes, estabelecendo a base para a terapia alvo direcionada levando a grandes avanços no tratamento do câncer como exemplificado pelo surgimento do inibidor BRAF (vemurafenibe) no tratamento do melanoma (DAVIES et al., 2002; SOSMAN et al., 2012).

Um profundo entendimento dos mecanismos que impulsionam a resistência aos medicamentos contra o câncer é, portanto, essencial para o desenvolvimento de terapias eficazes. A emergência de resistência não é surpresa, considerando que as células tumorais estão constantemente sob pressão evolutiva ditada pelos medicamentos, pela interação com o microambiente e entre células com diferentes composições genéticas e fenotípicas dentro do tumor (BASLAN & HICKS, 2017). A plasticidade celular e a heterogeneidade inter e intra-tumoral são, portanto, as duas principais fontes de resistência (HOLOHAN et al., 2013). A heterogeneidade intra-tumoral pode ser explicada por dois modelos diferentes: o “modelo de evolução darwinista” e o “modelo de célula-tronco tumoral”. O primeiro pressupõe mudanças estocásticas em uma população de células com potencial tumorigênico idêntico seguido de seleção de subclones, enquanto o segundo baseia-se no conceito de que apenas uma pequena porção de células no tumor, ou seja, células-tronco tumorais, tem potencial tumorigênico. A heterogeneidade, portanto, seria o resultado da aquisição hierárquica de eventos genéticos e epigenéticos. É provável que ambos os modelos coexistam *in vivo* em um tumor (HAMMERLINDL & SCHAIDER, 2018). A heterogeneidade inter-tumoral depende do local de crescimento maligno (por exemplo, a histologia do órgão, a presença de vasos, etc) e das taxas de

infiltração de diferentes células imunes. A dificuldade em identificar a heterogeneidade tumoral é frequentemente restrita a fatores como a proporção de clones e subclones do tumor e a contaminação das células do estroma presentes na amostra. Embora análises genômicas em larga escala tenham destacado a extrema complexidade do melanoma (THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015), leituras de seqüenciamento resultantes contêm seqüências misturadas de diferentes populações celulares tumorais e são confundidas por misturas de células normais. Assim, estes métodos analíticos podem sugerir a existência de heterogeneidade, mas possuem capacidade limitada para desvendar a complexa biologia por trás dela. Para identificar totalmente a dinâmica do desenvolvimento do câncer e entender a interação com o microambiente, é essencial compreender a heterogeneidade tumoral a nível celular, integrando a (epi) genômica e a transcriptômica de células individuais (BASLAN & HICKS, 2017).

A maior parte dos trabalhos sobre resistência a medicamentos se concentram em mutações pré-existentes ou adquiridas, mas está se tornando cada vez mais claro que eventos não genéticos desempenham papéis importantes e às vezes levam à aquisição de resistência, contribuindo para a plasticidade das células tumorais em diferentes situações adversas. Em particular, estudos *in vitro* recentes sugerem que condições estressantes, incluindo o tratamento com medicamentos, induzem um estado de tolerância reversível, não genético (SHARMA & LEE, 2010). Para compreender a plasticidade celular, por exemplo, como as células podem se modificar em diferentes estados fenotípicos, como as células tumorais adquirem capacidade invasiva deixando seu local de origem, bem como os mecanismos envolvidos na resistência às terapias, será necessário entender completamente a progressão do câncer. É importante ressaltar que o surgimento dessas células dormentes - "*drug tolerant persisters"* (DTPs) ou "induced drug-tolerant" (IDTCs - MENON et al., 2015) é observado em frequência mais elevada do que o esperado devido a mecanismos mutacionais. Além disso, este modelo é consistente com a evidência clínica de que pacientes com câncer tratados com uma variedade de terapias antitumorais podem ser re-tratados com sucesso com o mesmo medicamento após um intervalo das terapias, o chamado *drug holiday* (KURATA, TAMURA, KANEDA, 2004; SEGHERS et al., 2012). Criticamente, enquanto células geneticamente diferentes compartilham um estado fenotípico específico (por exemplo, células tronco-tumorais com capacidade aumentada de semear o tumor),

células geneticamente idênticas também podem adotar estados fenotipicamente distintos e, portanto, diferentes sensibilidades a terapias, demonstrando assim a existência de diferenças epigenética e transcriptômica (não-genéticas) (MARUSYK, ALMEDRO, POLYAK, 2012). Entender os mecanismos responsáveis pela geração e/ou reativação de DTPs será a chave para desenvolver estratégias terapêuticas mais eficientes capazes de superar a resistência à terapia.

1.3.1 Quimioterapias convencionais e imunoterapias

Em relação aos tratamentos para o melanoma, os protocolos clínicos até então utilizados tinham caráter meramente paliativo. Utilizavam-se altas doses de dacarbazina (DTIC) e Interleucina-2 (IL-2), sendo que as taxas de resposta não alcançam 10% e os efeitos secundários destes tratamentos podem ser graves (APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011). A dacarbazina é um agente alquilante que atua de maneira inespecífica levando a quebra da dupla fita de DNA e a apoptose. A interleucina-2 recombinante promove a proliferação e diferenciação dos linfócitos T e B, que reconhecem e destroem as células tumorais (ALMEIDA, 2010; DIPIRO et al., 2005; IBRAHIM, HALUSKA, 2009).

As abordagens imunoterapêuticas mais recentes têm sido direcionadas ao aumento da imunidade mediada por células através do bloqueio de *checkpoints* imunes (LUKE & HODI, 2013), como CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*) e PD-1 (*programed death 1*) / PD-L1 (ligantes de PD-1). Em 2011 foi aprovado pela FDA o uso do Ipilimumabe, um anticorpo monoclonal que atua contra o antígeno-4 (CTLA-4) presente nos linfócitos T citotóxicos. O CTLA-4 é um receptor essencial para o desenvolvimento de células T regulatórias e quando ativado pelas células apresentadoras de antígeno, transmite um sinal inibitório, que resulta em supressão da capacidade de resposta imune (FLAHERTY, HODI, FISCHER, 2012). Todavia, todos os pacientes que se beneficiaram (8-18%) com a regressão da doença também apresentaram significantes toxicidades autoimunes, como dermatites e colites (FLAHERTY, HODI, FISCHER, 2012; LUKE & HODI, 2013). Também aprovado em 2014, nivolumabe (FDA, 2016) é outro anticorpo monoclonal humano (IgG4) que bloqueia a interação PD-1/ PD-L1 ou PD-L2 interrompendo a sinalização negativa que regula ativação e proliferação de células T (WANG et al., 2014). Em estudo de fase 3, novilumabe demonstrou 40% de taxa de resposta objetiva em

pacientes que não apresentam mutação em BRAF, sobrevida livre de progressão de 5,1 meses e taxa de sobrevida total de 72,9% em 1 ano quando comparado com dacarbazina com 13,9% de resposta objetiva, 2,2 meses livre de progressão e 42,1% de sobrevida total. Efeitos adversos grau 3 e 4 foram observados em 11,7% dos pacientes (ROBERT et al., 2015). Em 2016, nivolumabe e pembrolizumabe (também atua no bloqueio de PD-1) foram aprovados para pacientes no Brasil (ANVISA, 2018). Embora eficazes, estas abordagens apresentam tempos variáveis de respostas entre os pacientes, o que permite novas lesões aparecerem antes do controle da doença, como já demonstrado com o ipilimumabe (LUKE & HODI, 2013).

1.3.2 Principais terapias alvo direcionadas

1.3.2.1 Inibidores de BRAF

Enquanto a imunoterapia é caracterizada pela indução de respostas duráveis em um número limitado de pacientes, a terapia direcionada tem sido caracterizada por altas taxas de respostas, mas a resistência aos tratamentos emerge universalmente em poucos meses (MERLINO, et al., 2016).

A via de MAPK está intimamente ligada ao descontrole da proliferação celular e devido à alta prevalência da mutação $BRAF^{V600E}$ nos casos de melanoma metastático, esta se tornou um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos altamente específicos. Desta maneira, o Vemurafenibe (Zelboraf; PLX4032; RG7204; Daiichi Sankyo/Roche) aprovado pela *U.S. Food and Drug Adminstration* (FDA) em 2011 foi primeiro potente inibidor competitivo adenosina-trifosfato, que ao se ligar seletivamente à proteína BRAF portadora da mutação V600E, atua inibindo a cascata de fosforilação da via das MAPK. Como resultado, as células do melanoma estacionam no período G1 do ciclo celular, o que ocasiona a regressão tumoral devido a uma ação apoptótica relacionada com a superexpressão de BIM (KUDCHADKAR, PARAISO, SMALLEY, 2012; KUDCHADKAR et al., 2013).

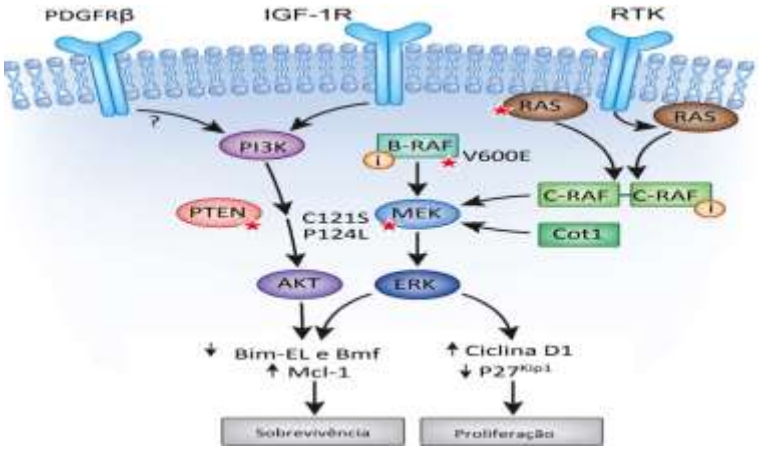
O desenvolvimento deste fármaco propiciou uma revolução no tratamento do melanoma metastático devido às altíssimas taxas de respostas alcançadas (81% dos pacientes - fase I da triagem clínica), além de resultar em aumento da sobrevida global (FLAHERTY et al., 2010). Entretanto, apesar da notável redução tumoral, os pacientes estão sujeitos a recidivas após 6-7 meses de tratamento e possibilidade

de ocorrer eventos cutâneos adversos secundários, tais como hiperqueratoses, queratoacantomas e carcinoma de células escamosas, em virtude da ativação paradoxal da via MEK-ERK em células normais mediada por CRAF levando a reativação da cascata de sinalização (GIBNEY et al., 2013).

Isso ocorre ao fato de que as respostas clínicas são transitórias ou limitadas a subgrupos restritos de pacientes por causa de resistências intrínsecas ou adquiridas/secundárias (PARAISO, SMALLEY, 2013; HOLOHAN et al., 2013).

A quimioresistência ao Vemurafenibe pode ocorrer por diversos mecanismos: via mutação adquirida in NRAS ou super-regulação de RTK, incluindo *Insulin-like growth factor1 receptor* (IGF-1R) e possivelmente *Plaleted-derived growth factor receptor β* (PDGFRβ); ativação da via MEK/ERK1/2 e super-regulação de MEK e *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8* (MAPK3P38 - Cot1); ou ativação da via PI3K-AKT paralela promovida pela perda de atividade/expressão de PTEN, muitas vezes através de mutação e super-regulação dos receptores RTK. A reativação das vias ERK1/2 e PI3K/AKT promove eventos incluindo superexpressão de ciclina D1 e baixa expressão de inibidor dependente de ciclina $p27^{kip1}$; em adição, estas vias promovem sobrevivência celular favorecendo a expressão de proteínas anti-apoptóticas como *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein* (Mcl-1), e mantendo baixos níveis de proteínas pró-apoptóticas como *Bcl-2 homologous 3* (BH3), *Bim-extra long* (Bim-EL) e *Bcl-2-modifying factor* (Bmf) (Figura 2) (APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011).

Figura 2. Vias de resistência ao Vemurafenibe



Fonte: APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011.

O tratamento para o melanoma metastático possui mais opções, como o Dabrafenibe (Tafinlar, GSK2118436, Novartis - aprovado em 2013 pela FDA), que pode atuar em diferentes genótipos da mutação V600 (E/K/D/R) em pacientes com estágio III e IV e ser utilizado nos casos do melanoma com metástase cerebral (MENZIES, LONG, 2013). Embora não haja estudos comparando diretamente pacientes que receberam vemurafenibe ou dabrafenibe como agentes únicos, efeitos adversos de grau 3-4 foram mais incomuns nos pacientes com dabrafenibe com redução da dose necessária em apenas 28% dos pacientes (3% descontinuada por intolerância) comparado a 38% dos pacientes com vemurafenibe (WELSH et al., 2016).

1.3.2.2 Novas possibilidades terapêuticas: Inibidores de MEK, ERK e AKT

Além dos inibidores de BRAF, estudos recentes têm descoberto novos alvos terapêuticos, como exemplo, o Trametinibe (Mekinist, GSK1120212, Novartis), um potente inibidor alostérico, seletivo e reversível da atividade de MEK1/2 com inibição da via MAPK sustentada. (FEDORENKO, GIBNEY, SMALLEY, 2013; KIM et al., 2013), aprovado em maio de 2013 (FDA) para o tratamento de pacientes com melanoma metastático com mutações $BRAF^{V600E}$ ou $BRAF^{V600k}$ (NCI, 2013).

Estudos pré-clínicos demonstraram que a inibição de MEK diminui a proliferação celular, causa parada de ciclo celular na fase G1 e induz a apoptose mesmo em linhagens de melanoma mutadas em BRAF (SOLIT et al., 2006). Este efeito citostático está relacionado com a inibição da expressão de ciclina D1, bem como a diminuição da expressão de $p27^{KIP1}$ e das proteínas responsáveis pela hiperfosforilação do retinoblastoma (SOLIT, et al., 2006; SMALLEY, et al., 2007). Trametinibe também produziu superior eficácia quando comparado a quimioterapia padrão, mas a comparação com os inibidores de BRAF sugerem que o inibidor de MEK é menos efetivo em termos de taxa de resposta e benefício na sobrevida livre de progressão (FLAHERTY et al., 2012; FLAHERTY, HODI, FISHER, 2012; WELSH et al., 2016). Embora a atividade terapêutica apresentada tenha validado a utilização do inibidor, esta foi demonstrada ser menor do que a observada com os inibidores de BRAF (FLAHERTY et al., 2012b). Além disso, pacientes que receberam tratamentos prévios com inibidores de BRAF tem menor benefício com o inibidor de MEK administrado em sequência, apresentando 1,8 meses de sobrevida livre de

progressão versus 4 meses para os pacientes que não receberam, sugerindo que os mesmos mecanismos de resistência aos inibidores de BRAF conferem resistência a monoterapia sequencial com inibidor de MEK (KIM et al., 2013). Porém, o agente trametinibe pode ser útil na redução da toxicidade e aumento da eficácia quando combinado com inibidor de BRAF em pacientes que tenham melanomas com as mutações BRAF V600E ou V600K (WEBER et al., 2012).

Comum a todos os mecanismos de escape da terapia combinada descritos é a observação de que a via MAPK se recupera rapidamente após o tratamento, como um indicador talvez da forte dependência das células de melanoma desta via de sinalização (PARAISO et al., 2010). Com estes achados, a triagem clínica tem iniciado tratamentos duplo-alvo BRAF e MEK em combinação. Estudos de fase 3 têm confirmado a eficácia da combinação, como aumento na sobrevida livre de progressão (9,4 – 11,4 meses), maiores taxas de respostas objetivas alcançadas (64-67% na terapia combinatória versus 51% com o dabrafenibe) e sobrevida total de 93% e 85% quando observado por 6 meses (LONG et al., 2014) e de 72% e 65% quando observados por 12 meses para terapia combinatória e inibidor de BRAF sozinho, respectivamente (ROBERT et al., 2015). Ambos trabalhos demonstram taxas de efeitos adversos semelhantes entre os grupos, porém as taxas de incidências de carcinoma células escamosas foram menores nos pacientes tratados com a terapia combinatória. Recente análise de sobrevivência com acompanhamento prolongado mostrou 3 anos de sobrevida total para 38% dos pacientes com a combinação (62% destes com desidrogenase lactato normal, é um biomarcador prognóstico no soro que em níveis elevados indica pior prognóstico) e 21% livre de progressão em 3 anos (WELSH et al., 2016).

Qualquer que seja o tratamento, a resistência ainda ocorre para a maioria dos pacientes (FLAHERTY et al., 2012; PARAISO, SMALLEY, 2013) e tem sido evidenciado recentemente que a terapia combinatória tem efeito clínico modesto quando utilizado em pacientes que já apresentam resistência a um inibidor de BRAF, demonstrando taxas de respostas objetivas de apenas 13-15% e sobrevida livre de progressão média de 3,6 meses (JOHNSON et al., 2014). Trabalhos como estes propiciaram a aprovação da FDA (novembro de 2015) da terapia combinatória com dabrafenibe (150 mg 2x ao dia) e trametinibe (2 mg 1x ao dia) para pacientes com melanoma metastático ou que não podem ser retirados por cirurgia. Pacientes com tratamentos prévios aos inibidores de BRAF ou de MEK não podem ser incluídos

(FDA, 2015). A terapia combinatória no Brasil com vemurafenibe + cobimetinibe (inibidor de MEK) foi aprovada pela Anvisa em maio de 2016 em virtude de melhores resultados do que a monoterapia (LARKIN, ASCIERTO, DRENO et al., 2014) e em dezembro de 2016, a combinação trametinibe + dabrafenibe também foi aprovada (ONCONEWS, 2018).

Em virtude da reativação de ERK1/2 ser um dos principais mecanismos de resistência aos inibidores de BRAF e MEK, alguns inibidores de ERK (CC-90003, GDC-0994, MK-8353 e Ulixertinibe) estão sendo avaliados em estudos clínicos fase I/II. Embora os ensaios iniciais tenham demonstrado que os inibidores de ERK podem superar os mecanismos de resistência existentes com os inibidores de BRAF e MEK, sendo a combinação dos três inibidores considerada a melhor estratégia terapêutica (RYAN et al., 2015), já foi demonstrado que novas mutações em ERK1/2 podem surgir conferindo resistência a alguns inibidores de ERK (GOETZ et al., 2014). Embora o tratamento combinatório com inibidores MEK/ERK tenha demonstrado melhor resposta, os dados indicam a necessidade de inibição de outras vias de sinalização paralelas, como inibidores de PI3K, que pode ser ativada juntamente com RAS por um mecanismo de resistência de feedback negativo de ERK (BUCHEIT & DAVIES, 2014; WELSH et al, 2016).

Vias como PI3K/AKT também são ativas em melanoma, pois tem capacidade de suprimir apoptose e controlar a entrada no ciclo celular (SMALLEY et al., 2006), demonstrando um importante papel nos mecanismos de resistência aos inibidores de BRAF e MEK (APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011). A perda de PTEN elimina o mecanismo de regulação negativa de AKT e outros componentes como *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (YAGIMA et al., 2012; FLAHERTY, HODI, FISHER, 2012; IBRAHIM, HALUSKA, 2009). A rapamicina é um agente inibidor de mTOR, que possui sinergismo na utilização com sorafenibe (inibidor de RAF quinases) (FLAHERTY, HODI, FISHER, 2012). Importantes estudos indicam esta via como importante adjuvante na terapia direcionada à via MAPK (SMALLEY et al., 2006; SMALLEY, FLAHERTY, 2009; YAGIMA et al., 2012; FLAHERTY, HODI, FISHER, 2012; FEDORENKO, GIBNEY, SMALLEY, 2013).

Existem muitos medicamentos da terapia alvo direcionada e atualmente a busca por estudos clínicos registrados na *U.S. National Library of Medicine* (NIH) demonstra a grande complexidade de combinações (182 estudos) e a importância destas terapias para o tratamento do melanoma (NIH, 2018).

1.4 Inibidores proteassomais

O sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) é responsável pela degradação da maioria das proteínas regulatórias em células eucarióticas, entre elas proteínas envolvidas com apoptose, ciclo celular, transcrição, reparo de DNA e muitos outros processos vitais celulares (NIKIFOROV et al., 2007; SOROLLA et al., 2008; CRAWFORD, WALKER, IRVINE, 2011). Curiosamente, muitos fatores pró-oncogênicos, como fatores transcricionais (*factor nuclear kappa B* - NF-κB), tanto quanto fatores pro- e anti-apoptóticos também são controlados por este sistema (JESENBERGER, JENTSCH, 2002).

Desde a década passada, inibidores farmacológicos da via ubiquitina-proteassoma têm sido testados como agentes terapêuticos antitumorais por indução de morte celular *in vitro* e *in vivo,* sendo um dos exemplos o Bortezomibe. Espera-se que a inibição da atividade proteassomal seja uma nova estratégia para a quimioterapia baseada na capacidade de superar os caminhos de quimioresistência, tanto quanto potencializar a atividade de outras terapêuticas do câncer (BROHEM et al., 2012), em virtude de células tumorais serem consideravelmente mais sensíveis ao bloqueio proteassomal do que células normais. Embora a maior taxa de replicação destas células contribua para esta sensibilidade aumentada, a interrupção da renovação das proteínas regulatórias do ciclo celular por inibição proteassomal tem demonstrado ser o papel chave (ADAMS, KAUFFMAN, 2004).

Inibidores proteassomais, como o bortezomibe, constituem a primeira classe de agentes que atuam especificamente alterando o catabolismo de proteínas, sendo introduzidos na clínica com espetaculares resultados em pacientes com mieloma múltiplo (RICHARDSON et al., 2003), uma doença na qual o IGF-1 tem um importante papel (TAGOUG et al., 2013), semelhante ao melanoma na possível ativação de uma quimioresistência ao vemurafenibe (APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011). Ainda que o bortezomibe tenha sido citotóxico para um amplo painel de linhagens tumorais, apresentou baixa distribuição do composto na pele (ADAMS, et al., 1999). O bortezomibe tem apresentado atividade modesta para tumores sólidos potencialmente relacionada a penetração sub-ótima nos tumores (PAPANDREOU et al., 2004), mas alterações na administração da dose (5 vezes por semana subcutâneamente) tem melhorado a concentração intratumoral, embora ainda seja insuficiente para obter boas respostas (BAHLEDA et al., 2017).

Embora estudos de triagem clínica do bortezomibe com melanoma avançado tem demonstrado baixas respostas, onde de 15 pacientes submetidos ao tratamento combinatório com dacarbazina (fase I), um paciente apresentou resposta completa durável (>42 meses) e outro com resposta parcial (6 meses de duração) (POKLEPOVIC et al., 2015), vários estudos com uso isolado ou em combinação com outras quimioterapias (Paclitaxel, carboplatina, temozolomida), imunoterapias (IL-2) ou com diversas terapias alvo direcionadas têm sido conduzidos no momento (NIH, 2018).

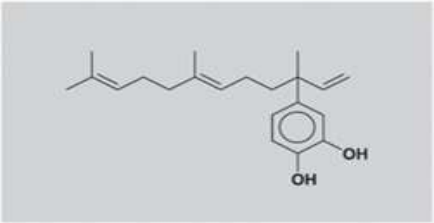
1.4.1. Nerolidilcatecol (4-NC), um inibidor proteasomal 20S

O 4-NC, um composto intensamente estudado em nosso laboratório, é derivado do catecol (figura 3) presente em duas espécies nativas da mata atlântica brasileira, a *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *P. peltata* (L.) Miq. Registrado na 1° Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1926), o extrato de *P. umbellata* tem sido utilizado como medicina tradicional brasileira, inclusive no tratamento de injúrias na pele, ao qual não foram detectados efeitos citotóxicos às suas células normais (BROHEM et al., 2012). Apresenta diversas atividades descritas devido ao seu efeito antioxidante (BARROS et al., 1996) e é capaz de impedir o dano ao DNA induzido em células normais por radicais hidroxilas dependentes de ferro (DESMARCHELIER et al., 1997). Ropke et al., (2006) demonstraram que o extrato bruto de *P. umbellata* reduziu a atividade das MMP's 2 e 9 em modelos *in vitro* e *in vivo* com modelo experimental de fotoenvelhecimento. Os autores postularam que a inibição *in vivo* foi resultado direto da capacidade do 4-NC em permear a pele. A avaliação da administração do 4-NC (10 mg/kg) em ratos (*Sprague-Dawley*) por via i.v. ou oral por CLAE/EM (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas) resultou em níveis plasmáticos máximos na ordem de 10 µg/mL e 42,5 ng/mL, respectivamente, analisados nos tempos entre 2,5 e 180 min. Houve ampla distribuição nos fluidos e tecidos orgânicos, com extensa metabolização da droga (REZENDE, 2002).

Por outro lado, o 4-NC apresentou efeitos citotóxicos contra glioblastoma (linhagens celulares A172 e T98G) e células leucêmicas K562 por mecanismos mitocondriais com parada do ciclo celular nas fases G1/G0 e S do ciclo celular promovendo apoptose (MASSARO et al., 2017; CORTEZ et al., 2015; BENFICA et al, 2017). Além disso, o 4-NC induziu autofagia nas células de glioma como

resultado de estresse celular para proteção dos efeitos deletérios do composto (MASSARO, et al., 2017). Também já foi demonstrado por nosso grupo que o 4-NC possui alta citotoxicidade para células de melanoma, incluindo linhagens com mutações NRAS ou BRAF, induzindo apoptose dependente de caspase-3, provavelmente após parada na fase G1 do ciclo celular, por aumento na produção de ROS, dano ao DNA, aumento na expressão de supressores tumorais (p53) e alterações no potencial de membrana. Seu modo de ação citotóxica é através da inibição UPS tempo-dependente das proteínas pró-apoptóticas Noxa que são capazes de se ligarem e neutralizarem Mcl-1 (proteína anti-apoptótica). Além de apresentar um efeito inibitório na capacidade de invasão e diminuição na atividade de MMP-2 destas células, o 4-NC demonstrou ainda inibir a proliferação das células de melanoma em modelo de pele artificial tridimensional (BROHEM et al., 2009, 2012). Este papel divergente do 4-NC pode estar relacionado com o fato que sob certas condições, como um ambiente fortemente oxidante, onde há falta de suporte para regenerar (reduzir) antioxidantes oxidados, alguns antioxidantes assumem características de pró-oxidantes, como a vitamina E (DONG et al., 2007; BROHEM et al., 2012).

Figura 3. Estrutura do 4-nerolidilcatecol (4-NC)



Fonte: BROHEM, et al., 2012

2. JUSTIFICATIVA

É evidente a revolução gerada com os inibidores específicos (BRAF e MEK) no tratamento de melanoma avançado, porém ainda existem os problemas com recidivas dos tumores, o que justifica a busca por novos compostos terapêuticos que possam superar ou minimizar esta quimioresistência.

Embora a ativação da via MAPK seja uma etapa chave na transformação oncogênica de melanócitos, é perceptível que apenas um menor número de pacientes se beneficia com um tratamento inibidor de agente único (BRAF ou MEK),

em virtude da reativação da via MAPK juntamente com grande probabilidade de quimioresistência (SMALLEY, FLAHERTY, 2009). Desta forma, a combinação de multiterapias é necessária na maioria dos casos para obter resultados mais eficazes e duradouros (SMALLEY et al., 2006; SMALLEY, FLAHERTY, 2009; PARAISO et al., 2010; YAGIMA et al., 2012; FLAHERTY, HODI, FISHER, 2012; FEDORENKO, GIBNEY, SMALLEY, 2013; GIBNEY et al., 2013).

Analisando as propriedades antitumorais do 4-NC, seu potencial como inibidor proteassomal é muito importante na indução de apoptose baseado na regulação negativa da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como Mcl-1 e nas características de inibição na proliferação das células de melanoma em modelos tridimensionais, através da diminuição de MMP-2. Desta forma, o 4-NC pode atuar como agente citotóxico nas células de melanoma humano resistentes aos inibidores mais utilizados atualmente, por ser tratar de um composto não específico para determinadas mutações. É sabido que os quimioterápicos não específicos podem apresentar uma citotoxicidade sistêmica maior do que os tratamentos específicos, porém a terapia combinatória com o vemurafenibe e o trametinibe visa diminuir a concentração necessária para induzir um efeito citotóxico nestas células.

3. OBJETIVOS

Este trabalho visa avaliar a possibilidade de superação da quimioresistência existente aos inibidores de BRAF (Vemurafenibe) e de MEK (Trametinibe) utilizando terapias combinatórias com 4-Nerolidilcatecol (4-NC) em células de melanoma humano resistentes aos inibidores, tendo como objetivos específicos:

- Gerar a plataforma de linhagens de melanoma duplo-resistentes aos inibidores de BRAF e MEK (vemurafenibe/trametinibe), confirmando sua resistência através de ensaios de citotoxicidade e western blotting;
- Avaliar a citotoxicidade do composto 4-NC administrado sozinho para as células parentais (mutadas para $BRAF^{V600E}$) ou em tratamento combinatório com inibidores de BRAF (Vemurafenibe) e de MEK (Trametinibe) para as culturas de células de melanoma humano resistentes e duplo resistentes.
- Analisar o potencial dos tratamentos propostos na indução da formação de colônias (Ensaio clonogênico) e em processos de invasão celular com modelos 2D (“Câmara de Boyden”) e 3D (esferoides).

- Investigar o mecanismo de morte celular gerada em células parentais, resistentes e duplo-resistentes com os tratamentos contendo 4-NC sozinho ou em tratamento combinatório (inibidores de $BRAF^{V600E}$ e de MEK).
- Avaliar o potencial da citotoxicidade do 4-NC em modelos xenográficos (*in vivo*) com células de melanoma humano SK-MEL-103 parental (NRas mutada) e SK-MEL-28 resistente ($BRAF^{V600E}$ mutada).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Ensaios *in vitro*

4.1.1 Cultura celular

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas linhagens de melanoma humano com mutações BRAF (V600E): SK-MEL19, SK-MEL28 e SK-MEL29. Foram utilizadas também células de melanoma humano SK-MEL-103 com mutação NRas (Q61R) nos ensaios *in vivo* (modelo xenográfico). Todas as linhagens parentais foram gentilmente doadas pela Profa. Dra. María Soengas do Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas de Madrid, Espanha.

4.1.2 Manutenção das culturas celulares

As células foram cultivadas a 37°C em placas de cultura contendo meio de crescimento específico, em estufa de cultura celular em atmosfera de 5% para manutenção de pH próximo ao fisiológico. Após atingirem 70-80% de confluência, as células foram lavadas com solução de PBS A 1X (tampão fosfato salino livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}) e, posteriormente, com auxílio de tripsina 0,1% (PBS A contendo 1 mM EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético) foram subcultivadas. Os estoques celulares foram mantidos em meio de cultivo contendo 8% DMSO (dimetilsulfóxido) a -196°C, em reservatório com nitrogênio líquido.

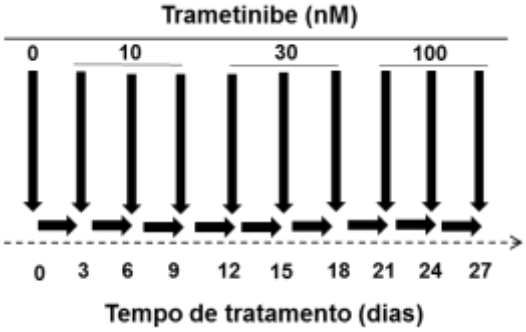
4.1.3 Geração da plataforma de células de melanoma humano duplo-resistentes aos inibidores B-RAF/MEK

Foram geradas recentemente em nosso laboratório três linhagens de melanoma humano resistentes ao inibidor de BRAF (Vemurafenibe) (SANDRI et al.,

2016). Brevemente, as linhagens SK-MEL-19, SK-MEL-28 e SK-MEL-29 foram plaqueadas em baixa densidade e tratadas com D10 (DMEM com 10% de soro fetal bovino – SFB) e baixas concentrações do agente vemurafenibe a cada três dias, com aumento gradativo da concentração, partindo de 0,5 µM até o máximo de 6 µM. As culturas celulares foram observadas diariamente, durante o período de aproximadamente 6 semanas para o acompanhamento da formação de colônias resistentes (NAZARIAN et al., 2010). As colônias formadas foram transferidas para uma nova placa de Petri para o crescimento e propagação da população celular resistente na presença de vemurafenibe.

Em seguida, sob minha responsabilidade, estas linhagens foram utilizadas para um novo processo, a geração da dupla-resistência, onde as linhagens foram mantidas em seu meio D-10 juntamente com a concentração máxima de vemurafenibe (3 uM para SK-MEL19 e 6uM para SK-MEL 28 e SK-MEL29), sendo que concentrações crescentes de trametinibe (10, 30 e 100 nM) foram adicionadas conforme a observação da seleção das células duplo-resistentes. Os meios foram trocados a cada três dias, e após as células atingirem a dupla-resistência, apresentando tempos diferentes para cada linhagem, foram mantidas sob o tratamento combinatório com os dois inibidores (vemurafenibe e trametinibe) até o momento dos ensaios.

Figura 4. Esquema da geração das linhagens duplo-resistentes a partir de linhagens resistentes

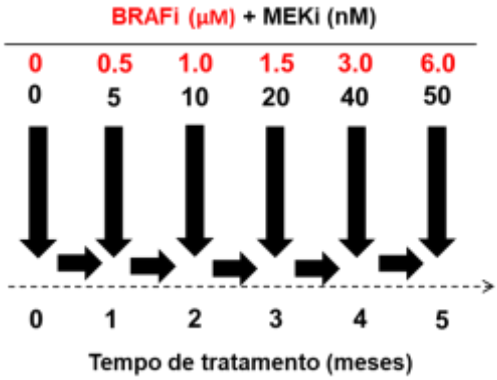


Fonte: Autoria própria. Foi utilizado o tratamento combinado com vemurafenibe (3 µM para SK-MEL-19 e 6 µm para as linhagens SK-MEL-28 e 29) e trametinibe (concentrações crescentes de 10 a 100 nM)

Em virtude da recente aprovação por parte da FDA (novembro de 2015), a terapia combinatória com inibidores de BRAF e MEK (dabrafenibe + trametinibe) foi permitida como tratamentos de primeira linha, somente para pacientes que não tenham sido expostos a tratamentos prévios com inibidores de BRAF (FDA, 2015),

decidimos mudar nossa estratégia de trabalho e gerar novas células duplo-resistentes a partir de linhagens parentais, sendo desta forma, submetidas ao tratamento com concentrações crescentes do tratamento combinado (vemurafenibe + trametinibe) desde o início (figura 5).

Figura 5. Esquema da geração das linhagens duplo-resistentes a partir de linhagens parentais



Fonte: Autoria própria. Foram utilizadas concentrações crescentes do tratamento combinado com vemurafenibe (de 0,5 a 6 µM) e trametinibe (de 5 a 100 nM).

4.1.4 Ensaios de confirmação da resistência das células de melanoma humano aos inibidores de BRAF e MEK

Para a caracterização da via de resistência das células de melanoma geradas aos inibidores foram realizados ensaios de Western blotting. Este ensaio também foi utilizado para avaliar a expressão proteica em extratos tumorais obtidos com ensaios *in vivo*.

Para a confirmação da resistência das células de melanoma geradas aos inibidores foram realizados ensaios de viabilidade celular (MTT) e Western blotting.

4.1.4.1 Ensaio de Imunofluorescência

Lamínulas de vidro estéreis foram adicionadas a placas de 24 poços, onde as células parentais, resistentes e duplo-resistentes foram plaqueadas ($1x10^4$ células/poço) e após 2 dias foram fixadas com formalina tamponada 10% gelada à temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e incubadas com solução de bloqueio por 1h (PBS 1x, BSA 0,2% e Triton-X 100). A incubação seguinte foi com a solução de faloidina/rodamina (R415, Invitrogen®) por 40 min. Lavagens (3x) com PBS 1x por 2 min cada para retirar o

excesso de marcação e as células foram incubadas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI - Vectashield® Mounting Medium) por 20 min. As lâminas foram montadas e armazenadas na geladeira (4°C).

4.1.4.2 Avaliação da viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular das linhagens de melanoma resistentes aos inibidores BRAF e MEK foram avaliadas pelo ensaio de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que é baseado na redução desse 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, consequentemente, a viabilidade celular. As células foram plaqueadas ($3x10^3$ células/poço) em placas de 96 poços e, após atingirem 60% de confluência foram incubadas com diferentes concentrações de trametinibe durante 72h. Após o período de tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas com solução de MTT 5mg/mL (PBS A) durante 3 horas. O precipitado (formazan) foi dissolvido em 200 µL DMSO/poço. A absorbância foi lida em leitor de microplaca a 570nm (DENIZOT, LANG, 1986).

4.1.4.3 Caracterização da resistência alcançada nas linhagens celulares por Western Blotting

As proteínas são separadas em gel de eletroforese Tris-glicina gradiente (4-20% - Mini-PROTEAN® TGX™ BIO-RAD) por 2h a 100V e, posteriormente, transferidas a uma membrana de polivinilideno difluorido (PVDF) em equipamento de transferência semi-seco (Trans-Blot® Turbo BIO-RAD), por 20 min a 1.0 Ampere, 25 V. Após bloqueio de reações inespecíficas com leite desnatado 5% em tampão Tris-glicina pH 7,5, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário *overnight* à 4ºC, em seguida, lavadas em tampão de lavagem e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase por 1h, temperatura ambiente. A detecção é realizada por sistema de quimioluminescência aumentada ECL (Amersham Pharmacia Bioteck, NJ, USA). A tabela 1 apresenta as principais informações sobre os anticorpos utilizados neste ensaio.

Tabela 1. Anticorpos utilizados no ensaio de western blotting para a confirmação da resistência das linhagens utilizadas

Proteina	Secondário	Diluição	Referencia	Fornecedores
ARAFt	Rabbit	1:1000	#4432	Cell Signaling
p-ARAF (Ser299)	Rabbit	1:1000	#4431	Cell Signaling
BRAFt	Rabbit	1:1000	#9433	Cell Signaling
p-BRAF (Ser445)	Rabbit	1:1000	#2696	Cell Signaling
CRAFt	Rabbit	1:1000	#9422	Cell Signaling
p-CRAF (Ser259)	Rabbit	1:1000	#9421	Cell Signaling
p-CRAF (Ser338)	Rabbit	1:1000	#9427	Cell Signaling
p-CRAF (Ser289/296/301)	Rabbit	1:1000	#9431	Cell Signaling
MEKt 1/2	Rabbit	1:1000	#9122	Cell Signaling
p-MEK 1/2 (Ser217/221)	Rabbit	1:1000	#9121	Cell Signaling
ERKt 1/2	Rabbit	1:1000	#9102	Cell Signaling
p-ERK (Thr202/Tyr204)	Rabbit	1:1000	#9101	Cell Signaling
EGFRt (1005)	Rabbit	1:200	Sc-03	Santa Cruz
p-EGFR (Tyr1173)	Rabbit	1:200	Sc-101668	Santa Cruz
Actina	Mouse	1:1000	A5441	SIGMA-ALDRICH
Vinculina	Mouse	1:1000	V9131	Sigma-Aldrich

Fonte: Autoria própria. RAF - *Serine/threonine-protein kinase* (ARAF, BRAF, CRAF); MEK - *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*; ERK1/2 - *extracellular signal–regulated kinases*; EGFR - *Epidermal growth factor receptor;* t – *total;* p – *phosphorylated.*

4.1.5 Avaliação da citotoxicidade com o tratamento combinado contendo 4-NC

4.1.5.1 Tratamentos utilizados nos ensaios

Para todos os ensaios realizados, o tratamento combinado foi utilizado para as células resistentes e duplo-resistentes aos inibidores de $BRAF^{V600E}$ (Vemurafenibe) e de MEK (Trametinibe), as quais foram mantidas em meio de cultura D-10 com adição de seus respectivos inibidores nas concentrações de 3 (SK-MEL-19) ou 6 µM (SK-MEL-28 e SK-MEL-29) para o vemurafenibe e de 50 nM para o trametinibe.

4.1.5.1.1 Preparação e isolamento do 4-nerolidilcatecol (4-NC)

Os extratos de *Phothomorphe umbellata* foram preparados a partir de raízes e folhas obtidas no campus da Universidade de São Paulo (DESMARCHELIER et al., 1997; ROPKE et al., 2006; BROHEM et al., 2009, 2012). Resumidamente, o material foi seco e moído. O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação em etanol (C_2H_6O - Merck):H2O (1:1), posteriormente foi concentrado a vácuo e o resíduo aquoso liofilizado. Seguido por extração líquido/líquido com hexano (1g/L), o volume

foi concentrado com rota evaporador e eluído em 5 mL de etanol p.a. (Merck, Darmstad, Germany). O 4-NC foi isolado por sistema HPLC (Thermo Separation Products – Consta Metric 3500) equipado com detector UV/VIS (LabAlliance, mod. 525), software Data Apex Clarity e uma coluna C18 (Phenomenex, Torrance, CA). A fase móvel utilizada foi metanol (CH_3OH - Merck): H_2O 9:1 com um fluxo de 4,0 mL/min seguida a detecção em 282nm. A estrutura do 4-NC foi deduzida por ressonância magnética nuclear de ^1H (300MHz) e ^{13}C (75MHz) e confirmada por comparação destas características espectrais com os valores já publicados (ROPKE et al., 2006). O 4-NC purificado a partir do extrato de *P. umbellata* por este método demonstrou 100% de pureza (ROPKE et al., 2006; BROHEM et al., 2009, 2012).

No dia dos ensaios o 4-NC foi pesado, diluído em concentração estoque de 10 mM de DMSO (100%) e mantido em freezer -20°C. Para o tratamento das culturas celulares, o composto foi diluído em DMEM (10% de FBS) até a concentração máxima de 0,5% de DMSO (50 µM de 4-NC) com o propósito de que os controles demonstrem 100% de viabilidade celular.

4.1.5.2 Curva de crescimento – Ensaio de Exclusão do Azul de Tripan

A curva de crescimento foi avaliada através da contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando o método de exclusão do corante Azul de Tripan (T6146, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As linhagens parentais, resistentes e duplo-resistentes foram plaqueadas em três concentrações diferentes ($1x10^4$, $3x10^4$ e $1x10^5$ células/poço – 24 poços) conforme Freshney, 2005 (p. 348-349), e após o período de 24, 48, 72 e 96 horas foram contadas. Para isso, as células foram coletadas com o auxílio de tripsina 0,1%, foram descartados os sobrenadantes e ressuspensas em meio D-10. Em seguida, foram incubadas com solução Azul de Tripan (0,4% em PBS-A) por aproximadamente 5 minutos. Neste ensaio, as células não viáveis podem ser identificadas pela coloração azul e contadas sob microscópio ótico, enquanto que células viáveis não são permeáveis ao corante (LIU, FU, MEYSKENS, 2009).

4.1.5.3 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar o potencial do 4-NC em linhagens parentais e resistentes, foram realizados ensaios de citotoxicidade pelo método de exclusão do azul de tripan (item

4.1.5.2) com tratamentos com as concentrações de 10, 30 e 50 μM de 4-NC por 24 horas. O cálculo da Concentração inibitória de 50% (IC_{50}) foi realizado com auxílio do software Excell por equação da reta linear. O composto Bortezomibe (PS-341, Selleckchem) foi utilizado como controle positivo na concentração de 100nM.

4.1.5.4 Avaliação do potencial do tratamento combinado na formação de colônias pelo Ensaio Clonogênico

As células foram plaqueadas em baixa confluência de $0{,}8x10^3$ células por poço (6 poços). Após 24 horas para aderência, as linhagens parentais foram tratadas com 4-NC (10 e 20 μM), as linhagens resistentes com o tratamento combinado de 4-NC e vemurafenibe (3 ou 6 μM) e para o tratamento da linhagem duplo-resistente também foi adicionado trametinibe (50 nM). Os tratamentos foram trocados a cada 3 dias conforme é feita a manutenção destas células. Após um período de aproximadamente duas semanas, os tratamentos foram retirados, as células lavadas com PBS e as placas foram coradas com uma solução de fixação e coloração (50% de Metanol, 0,5% de cristal violeta e 49,5% de H_20 Milli Q). A contagem do número de colônias por poço foi realizada por meio de imagens com o equipamento MS-FX Pro-*in vivo* e analisadas com auxílio do software Image J. O ensaio permite uma avaliação de diferenças na viabilidade reprodutiva entre células tratadas e não tratadas, ou seja, na capacidade de células isoladas em produzir colônias de 50 ou mais células (PUCK & MARCUS, 1956).

4.1.5.5 Avaliação do potencial do tratamento combinado na migração celular (Ensaio de “ferida”)

As células foram plaqueadas em confluência de $3x10^4$ células por poço (placa de 24 poços). Após atingirem a confluência de aproximadamente 90%, com o auxílio de uma ponteira de 200 μL foram realizadas fendas (“feridas”) no centro de cada poço. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1x e adicionados os tratamentos com meio de cultura DMEM +1% de SFB com 4-NC (10 ou 30 μM) para as linhagens parentais ou tratamento combinado (4-NC + vemurafenibe) para as resistentes. O experimento foi realizado até o momento em que a fenda tenha se fechado nos controles (aproximadamente 24 horas). As análises das áreas livres de células foram realizadas com o software Image J.

4.1.5.6 Avaliação do potencial do tratamento combinado na invasão celular (“transwell”)

Membranas transwell (8 mm pore size, Becton Dickinson) foram cobertas com 30 μL de Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, diluído 1:6 em DMEM livre de SFB). As células resistentes (SK-MEL-28 R) e duplo-resistentes (SK-MEL-28 DR) foram resuspensas ($3x10^4$ cels/poço) em DMEM livre de SFB e adicionadas no compartimento superior da câmara. Trezentos microlitros de DMEM suplementado com 10% de SFB foram adicionados na câmara inferior. O tratamento combinado (4-NC + vemurafenibe ou 4-NC + vemurafenibe + trametinibe) foi utilizado em ambos os compartimentos, superior e inferior. Após 24h, as células que migraram através do Matrigel foram fixadas em Gluteraldeído 3% (em PBS 1x), coradas com azul de toluidina 0,25% (em Na_2CO_3 2%) por 20 minutos antes da contagem em microscópio invertido (Axiovert S100, Zeiss, Germany). Em cada poço, dez campos independentes (20x) foram contados para quantificação.

4.1.5.7 Ensaio de esferoides 3D

O ensaio de crescimento esferoide tridimensional foi realizado conforme Smalley et al., (2006), o qual os esferoides melanoma foram preparados utilizando o método de sobreposição de líquidos da seguinte forma: células de melanoma humano resistentes foram adicionadas à uma placa revestida com Agar 1,5% e incubadas (72 h) para que se organizem em esferoides tridimensionais, que por sua vez, foram coletados e implantados em nova placa com gel de colágeno I bovino contendo EMEM, L-glutamina e 2% de FBS. Foi adicionado D-10 ao topo do colágeno solidificado, onde os esferoides foram então tratados com 4-NC em uso isolado ou tratamento combinatório e incubados por mais 24 h. Os esferoides foram analisados com o kit de viabilidade celular (calceína-AM e brometo de etídio - Molecular Probes, Eugene, OR) de acordo com as instruções do fabricante e as imagens obtidas com o auxílio de um microscópio invertido de fluorescência. A calceína-AM verde fluorescente indica a atividade da esterase intracelular e o brometo de etídio vermelho fluorescente indica perda da integridade da membrana plasmática, tornando possível distinguir as células vivas das células mortas.

4.1.5.8 Avaliação do potencial do tratamento com 4-NC em ensaio de angiogênese

Para avaliar a capacidade angiogênica das células de melanoma após o tratamento com o composto 4-NC, foi realizado, primeiramente, o ensaio de citotoxicidade por azul de tripan, como descrito no item 4.1.5.2, em células endoteliais t.END.1 por 24h nas concentrações de 15, 30 e 45µM de 4-NC. Após a determinação do citotoxicidade, o ensaio de formação de tubos foi realizado. Para isso, 50 ul de Matrigel foram adicionados em cada poço de uma placa de poços e permitiu-se a polimerização por 1 hora a 37°C. Células t.END.1 foram plaqueadas sobre o matrigel em uma densidade de $2,5x10^4$ por poço e tratadas com 4-NC nas concentrações de 7,5 e 15 µM, crescida em meio RPMI sem suplemento de fatores de crescimento em estufa a 37°C, 5% CO_2. Após 4h, a formação de tubo foi observada e as imagens foram fotografadas. Este ensaio foi realizado em colaboração com a pós-doutoranda do laboratório Érica Aparecida de Oliveira.

4.1.5.9 Investigação de morte celular gerada com o tratamento combinado (Citometria de Fluxo)

O ensaio de apoptose e necrose foi avaliado por meio da externalização da Fosfatidilserina (FS) e realizado por citometria de fluxo após a marcação com o conjugado fluoresceína (FITC)-Anexina V (Anexina V–FITC, 556420 BD Pharmingen™) e PI (Iodeto de propídio– P3566 Life Technologies), conforme Brohem et al., (2009). As células tratadas foram coletadas por tripsinização, centrifugadas, lavadas com PBS e então ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM, NaCl 2,5 mM $CaCl_2$). Anexina V-FITC (1mg/mL) foi adicionada às células que foram incubadas por 20 min à temperatura ambiente, no escuro. Logo após, adicionou-se 400 µL de solução de IP (20 µg/mL) e as células foram analisadas por citometria de fluxo. Anexina V é uma proteína ligada a fosfolipídeos que tem alta afinidade a FS. IP é utilizado para distinguir células viáveis de não viáveis, pois se intercala ao DNA. As fluorescências da anexinaV-FITC e IP são medidas com o auxílio do equipamento FACS Canto II (Becton & Dickinson). As análises foram realizadas utilizando o software “FACs Diva™” (Becton & Dickinson), que analisa 20.000 eventos por amostra.

4.1.5.10 Investigação do mecanismo de morte gerada com o 4-NC em uso isolado ou em tratamento combinado

4.1.5.10.1 Western blotting

A investigação do mecanismo de ação da citotoxicidade demonstrada pelo 4-NC foi realizada por ensaios de western blotting conforme o item 4.1.4.3. Foi analisada a expressão das principais proteínas da UPR que demonstram o desencadeamento do estresse do Retículo Endoplasmático com os anticorpos descritos na tabela 2.

Tabela 2. Anticorpos utilizados no ensaio de western blotting para a investigação do mecanismo de ação da citotoxicidade do 4-NC

Proteina	Secundário	Diluição	Referência	Fornecedores
t-eiF2a	Rabbit	1:1000	Ab157478	Abcam
p-eIF2a (Ser51)	Rabbit	1:1000	3597	Cell signaling
t-IRE1a	Rabbit	1:1000	3294	Cell signaling
p-IRE1a (S724)	Rabbit	1:1000	Ab48187	Abcam
t-ATF-4	Rabbit	1:500	Ab31390	Abcam
p-ATF4	Rabbit	1:500	Ab192580	Abcam
t-PERK	Rabbit	1:500	5683	Cell signaling
p-PERK (T981 + T982)	Rabbit	1:250	Ab192591	Abcam
GADD34	Rabbit	1:1000	Ab131402	Abcam
HERPUD1	Rabbit	1:1000	Ab150424	Abcam
Ero1-a	Rabbit	1:1000	3264	Cell signaling
CHOP	Mouse	1:1000	2895S	Cell signaling
Calnexina	Rabbit	1:1000	2679	Cell signaling
BiP	Rabbit	1:1000	3177	Cell signaling
PDI	Rabbit	1:1000	3501	Cell signaling
ATF-3	Rabbit	1:1000	Ab180842	Abcam
ATF-6	Rabbit	1:1000	Ab203119	Abcam
MITF	Mouse	1:1000	Ab12039	Abcam
HSP90	Rabbit	1:1000	45G5	Cell signaling
Vinculina	Mouse	1:1000	V9131	Sigma-Aldrich

Fonte: Autoria própria. eIF2a (*eukaryotic initiation factor α2*); IRE1 (*phospho-inositol requiring enzyme 1*); ATF-4 (*Activating transcription factor 4*); PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*); GADD34 (*phosphatase growth arrest and DNA damage inducible gene 34*); HERPUD1 (*Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein*); Ero1-a (*ER oxidoreductin 1;* CHOP (*CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*); BiP (*Binding immunoglobulin protein*); PDI (*Protein disulfide isomerase*); ATF-3 (*Cyclic AMP-dependent transcription fator*); ATF-6 (*activating transcription factor-6*); MITF - *Microphthalmia-associated transcription fator*; HSP90 – *Heat Shock Protein 90*; t- t*otal* and p-*phosphorylated.*

4.1.5.10.2 Manipulação de genes para silenciamento através de shRNA

Para avaliar a interferência da proteína CHOP na apoptose observada nas linhagens de melanoma humano do estudo, foi realizado o silenciamento de CHOP humano com vetores obtidos na biblioteca TRC shRNA disponível na “Molecular Screening Facility” do Wistar Institute, Fildadelfia, EUA. Os clones de CHOP (shRNA) utilizados foram: TRCN0000007263, TRCN0000007264, TRCN0000007265 e TRCN0000007266 em células de melanoma SK-MEL-28 parentais, resistentes e duplo-resistentes aos inibidores de BRAF/MEK. O vetor vazio PLKO-1 foi utilizado como controle negativo. A produção lentiviral foi realizada como descrito no protocolo desenvolvido pela biblioteca da TRC (*Broad Institute*). Resumidamente, as células HEK 293T foram co-transfectadas com vetores de shRNA e plasmídeos de empacotamento lentiviral. O sobrenadante contendo vírus foi coletado com 36 e 60 horas após a transfecção, combinado e filtrado através de um filtro de 0,22 µm e armazenado em -80°C até o momento de uso. No dia de infecção das células de interesse, foi adicionado 1 mL de meio contendo vírus em cada poço (placa - 6 poços) em volume final de 2,5 mL e deixadas por 48 horas. Após este período, o meio foi trocado e as células selecionadas usando 0,5 µg/mL de puromicina.

Para validar o gene CHOP manipulado, o lisado de proteínas total foi extraído das células de melanoma e o western blotting foi realizado de acordo com descrito em Kaur e colegas (KAUR et al., 2016). As membranas foram cortadas e incubadas com anticorpo anti-*Heat shock Protein 90* (HSP90) como controle endógeno.

4.1.5.10.3 Ensaio de exclusão do azul de tripan

As linhagens silenciadas e controles foram plaqueados ($3x10^4$ células/poço) em placa de 24 poços, mantidas durante um período de 48 horas para completa aderência das células e foram tratadas por 24 horas com 4-NC (10, 30 ou 50 µM) em uso isolado ou em combinação com inibidores de BRAF (PLX4032 6 µM) e de MEK (50 nM Tramentinibe). A viabilidade celular foi avaliada contando células vivas versus células mortas em uma câmara de hemocitômetro utilizando a coloração com Azul de Tripan (0.4% em PBS).

4.2 Ensaios *in vivo*

4.2.1 Camundongos

Camundongos fêmeas BALB/c nude (*nu*/*nu*) e BALB/c, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação (Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da Universidade de São Paulo), foram utilizados neste estudo de acordo com a aprovação do Comitê de Ética (Ofício CEUA/FCF/70-2012 – USP). Os animais foram anestesiados com 0,02 mL de solução contendo 20 mg/kg de quetamina e 15,2 mg/kg de xilazina por injeção subcutânea para a coleta das amostras de sangue no dia da eutanásia. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical logo após a coleta do sangue.

4.2.2 Ensaios Toxicológicos

4.2.2.1 Ensaio Toxicológico – Agudo – 5 e 10 mg/kg (I.P.)

A avaliação da toxicidade por *via intraperitoneal* do composto 4-NC diluído em DMSO:H_2O foi realizada de maneira semelhante ao protocolo nº425 descrito pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD/OCDE - Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure, 2006), que utiliza grupos experimentais com dose única do composto testado. O ensaio toxicológico agudo foi realizado com as doses de 5 e 10 mg de 4-NC por kg de peso corpóreo, administrado intraperitonealmente (200uL).

Camundongos BALB/c nude, de 8-10 semanas de idade foram divididos em 3 grupos experimentais com duas doses testadas:

- Grupo Controle (2 camundongos) – animais que receberam DMSO diluído em H_2O ultrapura estéril (40 µL em 200 µL – volume final);
- Grupo Teste 1 (2 camundongos) - animais que receberam 5 mg/kg de 4-NC diluído em DMSO e H_2O ultrapura estéril (1:5).
- Grupo Teste 2 (2 camundongos) - animais que receberam 10 mg/kg de 4-NC diluído em DMSO e H_2O ultrapura estéril (1:5).

Após a administração, os animais foram acompanhados diariamente por 14 dias e sacrificados no dia seguinte por inalação em Câmara de CO_2. Durante o período do ensaio, os animais foram avaliados para diferentes sinais como: morte,

comportamento, alterações na pelagem, olhos, mucosas, respiração, batimentos cardíacos, tremor, convulsão, salivação, diarreia, sono, coma, dor local, letargia e peso corpóreo. No momento da necropsia, os órgãos selecionados (fígado, rim, baço, pulmão e cérebro) foram pesados e analisados quanto a presença de alterações macroscópicas.

4.2.2.2 Ensaio Toxicológico – Doses repetidas - Tratamento subcutâneo (s.c.)

O ensaio toxicológico foi realizado com base no protocolo n. 452 descrito pela OECD/OCDE (Estudos de Toxicidade Crônica, 2009) com modificações. Foram utilizados cinco camundongos fêmeas BALB/C (15-20g) por grupo (grupos não tratados, controle DMSO, 4-NC I e II). Os animais do grupo 4-NC II foram sacrificados 1 mês após o último tratamento com 4-NC. Os camundongos foram tratados por via subcutânea (s.c.) 3 vezes por semana durante 3 semanas, como no experimento com modelos xenográficos com as células tumorais de melanoma. O estudo incluiu pesagem dos animais após cada dose e observações detalhadas após a eutanásia (exames hematológicos, mielograma e bioquímicos), bem como procedimentos de necropsia e histopatologia dos tecidos. As análises de sangue periférico e da medula óssea foram realizadas em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter do laboratório de Hematologia – Prof. Ricardo Fock (FCF/USP).

4.2.2.2.1 Histopatologia dos tecidos

Após a eutanásia, o fígado, pulmões, cérebro e rins foram pesados e fragmentos fixados em formalina10%. O tecido fixado foi incorporado em parafina e depois seccionado e corado. A análise histopatológica foi realizada pelo Dr. Aloisio Souza Felipe da Silva (patologista do Departamento de Patologia e Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do HU/USP) e as fotomicrografias foram obtidas em microscópio de contraste de fase (NIKON Eclipse Ti, Melville, NY, EUA).

4.2.2.2.2 Hemograma

O hemograma foi realizado a partir de sangue total. O volume hematócrito, a dosagem de hemoglobina e contagem global de hemácias e leucócitos foram

realizadas em analisador automático de células sanguíneas ABC Vet (ABX Diagnostics®, Horiba, Kyoto, Japão).

4.2.2.2.3 Obtenção de células da medula óssea

Após a eutanásia, os fêmures e tíbias de cada animal foram retirados. Com o auxílio de agulha e seringa, foi feita a lavagem das cavidades ósseas com meio de cultura McCoy 5A (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de SBF (Cultilab®, Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). Após a coleta, as suspensões celulares foram centrifugadas (1200 rpm por 10 minutos), os sobrenadantes desprezados e as células cuidadosamente ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura.

4.2.2.2.4 Contagem de TNC (Total Nucleated Cell) da MO (Medula Óssea)

A partir das células obtidas, conforme descrito no item 4.2.2.2.3, foi realizada a contagem total de células nucleadas em hemocitômetro de Neubauer após diluição das amostras em líquido de Turk.

4.2.2.2.5 Avaliação das populações de células hematopoéticas da MO por citometria de fluxo

As populações de células hematopoéticas foram avaliadas por citometria de fluxo nas amostras de TNC (*Total Nucleated Cells*) *ex vivo* (obtidas conforme item 4.2.2.2.3). Para tanto, foi utilizado o painel de anticorpos descrito na tabela 3. Para avaliação da viabilidade celular, foi utilizado o corante FVS780 (BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780, BD Biosciences Pharmigen™, San Jose, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Após a marcação com os anticorpos, o perfil fenotípico foi obtido por citometria de fluxo em citômetro FACS Canto II (FACScan®, BECTON DICKSON, San Jose, EUA). Os resultados foram analisados com o software FlowJo® (Tree Star Inc., Ashland, EUA). Para a avaliação das populações celulares, foi utilizada a estratégia de análise descrita na tabela 4 (WEISSMAN & SHIZURU, 2008; SPANGRUDE, HEIMFELD & WEISSMAN, 1988; UCHIDA & WEISSMAN, 1992; WEISSMAN, 2000; PEARCE et al., 2004; BRYDER, ROSSI & WEISSMAN,

2006). Para o ajuste de compensação, foram utilizadas *beads* (BD™ Compbeads, BD Biosciences Pharmigen™, San Jose, EUA) e para a definição dos *gates* de análise, foi utilizada a técnica de FMO (*Fluorescence minus one*).

Tabela 3: Painel de anticorpos para caracterização imunofenotípica das MNC*

População celular	Anticorpos[1]	Fluorocromo
CTH* e Progenitores hematopoéticos	CD3	PE
	CD11b	PE
	Ter119	PE
	Ly6G (GR1)	PE
	CD19	PE
	CD135 (FLK2)	PE
	Sca-1	FITC
	CD90.1	PECy7
	c-Kit	APC
Progenitores Mielóides	CD3	PE
	CD11b	PE
	Ter119	PE
	Ly6G (GR1)	PE
	CD19	PE
	Sca-1	PE
	CD127 (IL7r)	PE
	CD34	FITC
	FCR	PECy7
	c-Kit	APC
Progenitores Linfóides	CD3	PE
	CD11b	PE
	Ter119	PE
	Ly6G (GR1)	PE
	CD19	PE
	CD127 (IL7r)	FITC
	Sca-1	PECy7
	c-Kit	APC
Células Mielóides Maduras	Ly6G (GR1)	PE
	F4/80	APC
	CD11b	FITC
Eritrócitos	Ly6G (GR1)	APC
	Ter119	PE
Linfócitos B	Ly6G (GR1)	APC
	B220	FITC
	CD19	PerCp-Cy 5.5

[1] BD Biosciences Pharmigen™; *MNC – Mononuclear Cells; CTH - Célula tronco hematopoética. Phycoerythrin (PE); Fluorescein isothiocyanate (FITC); PECy7 – fluorocromo em tandem que combina PE e um corante cianina Cy7; Allophycocyanin (APC); PerCp-Cy 5.5 – fluorocromo em tandem que combina PerCp (*Peridinin-chlorophyll proteins*) com um corante cianina. Tabela elaborada em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter.

Tabela 4. Estratégia de análise das populações de interesse por citometria de fluxo

População	Classificação	Fenótipo*
CTH	Célula tronco hematopoética (CTH)	$LIN^{-}FLK2^{-}Thy1.1^{low}Sca\text{-}1^{+}c\text{-}Kit^{+}$
	Progenitoras hematopoéticas (HP)	$LIN^{-}FLK2^{-}Thy1.1^{low}Sca\text{-}1^{-}c\text{-}Kit^{+}$
Progenitores Mielóides	Progenitor de granulócitos e Monócitos (GMP)	$LIN^{-}IL7r^{-}c\text{-}Kit^{+}Sca\text{-}1^{-}CD34^{+}Fc\gamma R^{high}$
	Progenitor mielóide comum (CMP)	$LIN^{-}IL7r^{-}c\text{-}Kit^{+}Sca\text{-}1^{-}CD34^{+}Fc\gamma R^{low}$
	Progenitor eritróide e megacariocítico (MEP)	$LIN^{-}IL7r^{-}c\text{-}Kit^{+}Sca\text{-}1^{-}CD34^{-}Fc\gamma R^{low}$
Progenitores Linfóides	Progenitor linfóide comum (LP)	$LIN^{-}Thy1.1^{-}IL7r^{+}Sca\text{-}1^{+}c\text{-}Kit^{+}$
Células Mielóides Maduras	Granulócitos	$CD11b^{+}Ly6G^{+}$
	Monócitos/Macrófagos	$CD11b^{+}F4/80^{+}$
Eritrócitos	Eritrócitos	$Ly6G^{-}Ter119^{+}$
Células Linfóides Maduras	Linfócitos B	$Ly6G^{-}B220^{+}CD19^{+}$

*LIN corresponde a CD3, CD11b, Ter119, Ly6G (Gr-1) e CD19. Tabela elaborada em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter.

4.2.2.2.6 Análises bioquímicas no sangue

As dosagens de fosfatase alcalina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamiltransferase (GGT), ureia e creatinina foram realizadas em soro em autoanalisador Roche Cobas® 6000 (Roche Diagnostics, Alemanha).

4.2.3 Ensaios Tumorigênicos

4.2.3.1 Ensaio Tumorigênico - Tratamento intraperitoneal - 10mg/kg

Diante dos resultados *in vitro* obtidos por Brohem et al., (2009; 2012), percebemos a necessidade de ensaios *in vivo* para avaliação da eficácia do 4-NC em animais portadores de melanoma sem qualquer quimioresistência e decidimos realizar um experimento tumorigênico com modelos xenográficos (Aprovação no CEUA/FCF/70/2012). Desta forma, os animais foram mantidos no Biotério de Criação e Experimentação da FCF/IQ, USP, durante pelo menos 15 dias antes do início dos experimentos. O biotério possui uma temperatura ambiente controlada de 21 ± 2ºC e um ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os camundongos foram alojados em caixas, separadas por grupo, com no máximo 4 animais por caixa e mantidos com alimentação padrão Labina (Purina®) e água corrente *ad libitum.*

Foram realizados três experimentos independentes, que no total, empregaram dezoito camundongos da linhagem BALB/c Nude de 8-12 semanas (15-20g) foram inoculados por via subcutânea (s.c.) com células de melanoma humano SK-MEL-103 ($5x10^5$ células), e após o tempo de latência de aproximadamente 7 dias (tempo necessário para o desenvolvimento do tumor), o tratamento por via intraperitoneal (i.p. - 200µl) com 10 mg de 4-NC por kg de peso corpóreo foi realizado 3 vezes por semana, durante 3 semanas.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 3 grupos experimentais:

Grupo NT: 3 animais que não receberam tratamento;

Grupo Controle (DMSO): 5 animais que receberam tratamento com DMSO diluído em H_2O ultrapura estéril (40 µL em 200 µL – volume final);

Grupo Tratado (4-NC): 10 animais que receberam tratamento com 10 mg/kg de 4-NC diluído em DMSO e H_2O ultrapura estéril (1:5).

Durante os dias de tratamento, os animais foram avaliados para diferentes parâmetros de caráter geral tais como: mudanças comportamentais, peso corpóreo e medida de largura e comprimento do tumor (volume tumoral). O volume do tumor (V) foi estimado de acordo com a fórmula $V = Largura^2 \times Comprimento/2$ descrita por Mansour *et al*., (2003) e Fernández *et al*., (2005). Ao final do período de tratamento (dia seguinte ao último tratamento), os animais foram sacrificados e observados macroscopicamente quanto à presença de nódulos metastáticos em pulmão e fígado. No dia da eutanásia os animais foram submetidos à realização de

imagens digitais tomográficas com o equipamento Micro PET-CT, disponível no IPEN/USP, para observação da presença do tumor e sua localização. Após a eutanásia, os tumores foram coletados para análise de western blotting (proteínas p53 e PARP) e PCR em tempo real (MMP2, MMP9 e MMP14).

4.2.3.1.1 Análise de Expressão gênica por PCR em tempo real dos tumores

4.2.3.1.1.1 Extração do RNA total

O RNA total dos tumores foi extraído utilizando-se o RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), segundo informações do fabricante. O RNA total, previamente aquecido a 65ºC por 5 minutos, foi quantificado através do espectrofotômetro de luz UV a 260 nm e sua qualidade foi verificada pela relação A_{260}/A_{280} e por corrida em gel de agarose 1,5%, visualizado sob a luz ultravioleta após coloração com Gel Red (Biotinum).

4.2.3.1.1.2 RT-PCR em tempo real

Para a reação de PCR em tempo real foi utilizado o método Taqman® (Life Technologies, USA). Os cDNAs oriundos das amostras de células tumorais de melanoma foram diluídos para a concentração de 50 ng/µL. As reações foram feitas para um volume final de 10 µL contendo 0,5 µL da mistura de pares de *primers* (*forward* e *reverse*) com a sonda FAM-NFQ de cada gene, 1 µL de cDNA, 5 µL de 2X Taqman® Gene Expression Master Mix (Life Technologies, USA) e 3,5 µL de água livre de Rnase. Para o ensaio, os primers utilizados foram fornecidos pelo fabricante (Life Technologies, USA), que não especificam a sequência nucleotídica, entretanto, garantem a especificidade e funcionalidade do ensaio. Para a análise do mRNA, o nível relativo da expressão gênica foi calculado em relação à expressão dos controles endógenos (β-ACTINA e GAPDH) utilizando o método Ct (cycle threshold method) (LIVAK AND SCHMITTGEN, 2001).

O ensaio de PCR em tempo real pelo método Taqman® foi realizado no equipamento ABI Prism® 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem, NJ, EUA), nas seguintes condições: ativação da enzima AmpErase®UNG a 50°C por 2 minutos, seguida da desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C para término do processo de desnaturação e por fim anelamento e

elongação dos *primers* e sonda a 60°C por 1 minuto. Para todos os experimentos serão realizadas triplicatas experimentais das amostras com duplicata técnica. Os genes estudados foram: MMP2, MMP9, MMP14, β-ACTINA e *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) (Tabela 5).

Tabela 5. P*rimers* utilizados no ensaio de RT-PCR em tempo real

Gene	Código do primer
MMP2	Hs01548727_m1
MMP9	Hs00234579_m1
MMP14	Hs01037009_g1
β-actina	Hs01060665_g1
GAPDH	Hs02758991_g1

Fonte: Autoria própria. MMP – metaloproteinases 2, 9 e 14; GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

4.2.3.1.2 Análise de expressão proteica dos tumores

As proteínas dos tumores foram extraídas por homogeneização (TURRAX, IKA) e analisadas conforme o item 4.2.3.1 As proteínas analisadas foram: p53 (Vector VP-P955), *Poly (ADP-ribose) polymerase* - PARP (9532 - Cell signaling), Caspase-3 (9662S - Cell signaling) e Caspase-9 (9502S - Cell signaling).

4.2.3.2 Ensaio Tumorigênico - Tratamento subcutâneo - 10mg/kg

Com o intuito de aproximar o ensaio pré-clinico da clínica, foi realizado um ensaio piloto com 3 camundongos fêmeas BALB/c nude analisando a eficácia do 4-NC com o tratamento subcutâneo seguindo o mesmo protocolo dos ensaios anteriores (10 mg/kg de peso corpóreo, 3x por semana durante 3 semanas). O acompanhamento e as análises foram realizados conforme o item 4.2.2.1. No dia do sacrifício, foram coletadas amostras de sangue e de medula óssea (MO) para análise do hemograma e contagem de células da MO.

4.2.3.3 Ensaio Tumorigênico – Inoculação das células resistentes – Tratamento subcutâneo – 10 mg/kg

Para a avaliação do tratamento com 4-NC em células resistentes, $2,5x10^6$ células de melanoma humano SK-MEL-29 R ou SK-MEL-28R embebidas em meio específico (75 μL de matrigel, 1,5 μL de HEPES e 73,5 μL de meio L15) foram inoculadas no flanco direito de camundongos fêmeas BALB/c nude (PHADKE, SINI & SMALLEY, 2015). Após a inoculação, os animais foram acompanhados para o aparecimento dos nódulos tumorais, porém as células resistentes não foram capazes de formar tumores subcutâneos neste estudo, mas possíveis metástases foram observadas e analisadas por imunohistoquímica com anticorpo anti-melanoma (ab732 – Abcam). Os animais inoculados com a linhagem SK-MEL-28 R foram tratados subcutâneamente com 4-NC por 3 vezes por semana durante 3 semanas. Após a eutanásia, os órgãos (pulmão, fígado e cérebro) foram coletados para a avaliação das possíveis metástases por imunohistoquímica com anticorpo anti-Melan-A (MART-1, clone A103 - DAKO). Estas análises foram realizadas como parte do meu doutorado sanduíche no Wistar Instituto (Filadélfia – Pensilvania, EUA).

4.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e analisados estatisticamente usando o software Graphpad *Instat* (Teste T) para comparação dos valores de IC_{50} nos ensaios de viabilidade por exclusão do azul de tripan e MTT. O programa *Graphpad Prism* (Regressão não-linear – equação de crescimento exponencial) foi utilizado para cálculo dos tempos de dobramento de cada linhagem. Os experimentos *in vivo* foram avaliados com o auxílio do teste *One-way analysis of variance,* ANOVA e para o ensaio toxicológico o teste *Kruskal-Wallis* foi utilizado. Todas as análises foram consideradas com um valor de significância de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

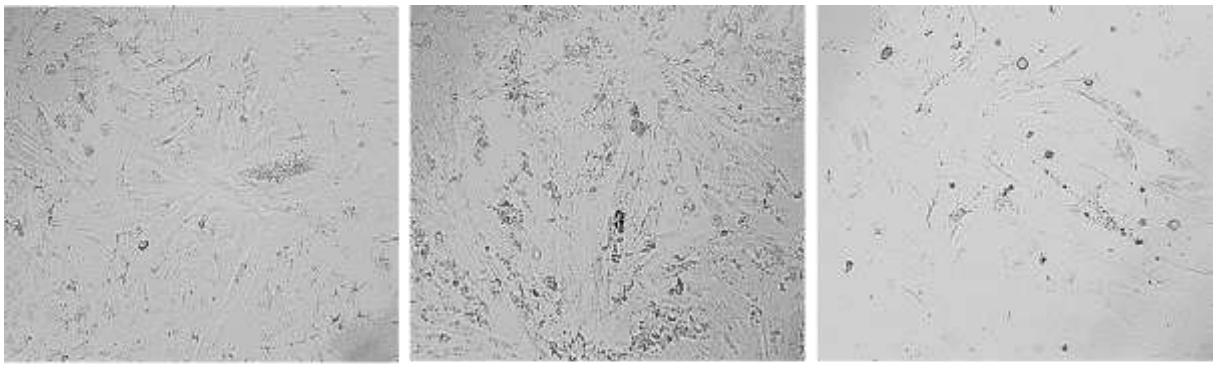
5.1 Ensaios *in vitro*

5.1.1 Geração e caracterização da plataforma de células de melanoma humano duplo-resistentes aos inibidores B-RAF/MEK a partir de linhagens resistentes

Este projeto foi iniciado com a geração das linhagens duplo-resistentes aos tratamentos com vemurafenibe e trametinibe (inibidores de B-RAF^{V600E} e MEK respectivamente) a partir das células resistentes ao vemurafenibe (SK-MEL 19 - 3µM e SK-MEL-28 e SK-MEL-29 - 6 µM).

Algumas particularidades foram observadas na geração desta primeira plataforma de células duplo-resistentes. A linhagem SK-MEL-28 apresentou um comportamento diferenciado em relação as outras linhagens (SK-MEL-19 e SK-MEL-29) com a não observação de células mortas no sobrenadante em cultura durante os tratamentos com ambos os inibidores, sendo identificado apenas diminuição na proliferação celular em relação a sua parental. Por este motivo a concentração de trametinibe foi aumentada muito rapidamente, de forma que no 11°dia já estávamos na concentração de 100nM (Figura 6). Alterações morfológicas e de tamanho foram identificadas (Figura 7) com a linhagem SK-MEL-28 P (parental) possuindo dendritos mais prolongados, assemelhando-se mais a uma célula epitelial, a linhagem SK-MEL-28 R apresentando contornos celulares menos definidos, dificultando até mesmo o foco da imagem microscópica para a obtenção das fotos e estas características se acentuaram conforme o aumento da concentração de trametinibe. Pensando nesta resistência intrínseca observada na linhagem SK-MEL-28 R, concentrações maiores de trametinibe (300 nM) foram testadas, mas sinais de morte celular foi identificado por meio da vacuolização citoplasmática, fragmentação nuclear e consequentemente apresentando *debris celulares* (Figura 8). Por esta razão, as células duplo-resistentes geradas com a concentração de 6 µM de Vemurafenibe e 100 nM de trametinibe (Figura 9) foram utilizadas e esta foi a concentração estabelecida também para as outras linhagens para efeito de padronização.

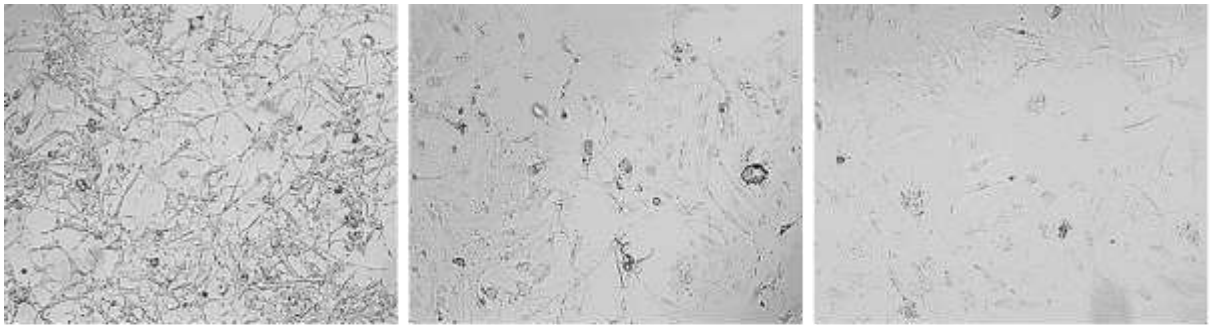
Figura 6. Geração da dupla-resistência da linhagem SK-MEL-28



SK-MEL-28 R tratada com 10nM de TRA | SK-MEL-28 R tratada com 30nM de TRA (8°dia) | SK-MEL-28 R tratada com 100nM de TRA (11°dia)

Fonte: Autoria própria. SK-MEL-28 R no início do tratamento com 10nM de trametinibe (TRA) SK-MEL-28 R com concentração de trametinibe alterada para 30nM no 8°dia; SK-MEL-28 R com concentração alterada para 100nM no 11°dia. Aumento de 100x.

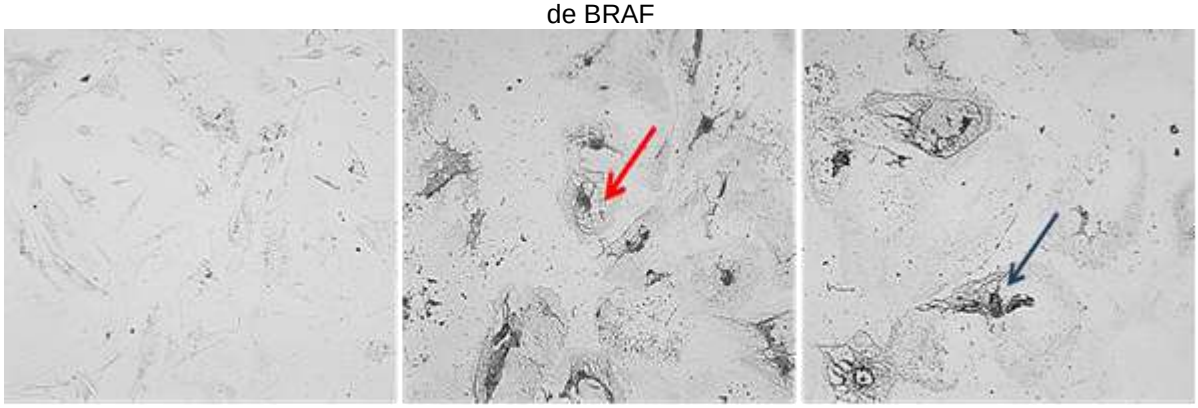
Figura 7. Comparação da morfologia entre as diferentes linhagens SK-MEL-28 P, SK-MEL-28 R e SK-MEL-28 DR



SK-MEL- 28 P | SK-MEL-28 R | SK-MEL-28 DR com 6μM de PLX e 100nM de TRA (71°dia)

Fonte: Autoria própria.Linhagens SK-MEL-28 parental (P), resistente (R) e duplo-resistente (DR). Aumento de 100x

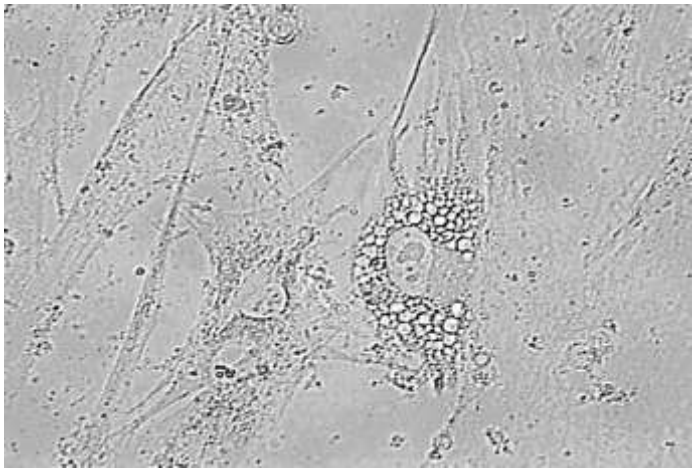
Figura 8. Demonstração de alteração morfológica da linhagem SK-MEL-28 tratada com os inibidores de BRAF



SK-MEL-28 DR tratada com 300nM de TRA (28° dia) | SK-MEL-28 DR tratada com 300nM de TRA (46°dia) | SK-MEL-28 DR tratada com 300nM de TRA (64°dia)

Fonte: Autoria própria. Início do tratamento com 300nM de trametinibe no 28°dia; vacuolização celular apresentada no 46°dia (seta vermelha); fragmentação nuclear no 64°dia (seta azul). Aumento de 100x.

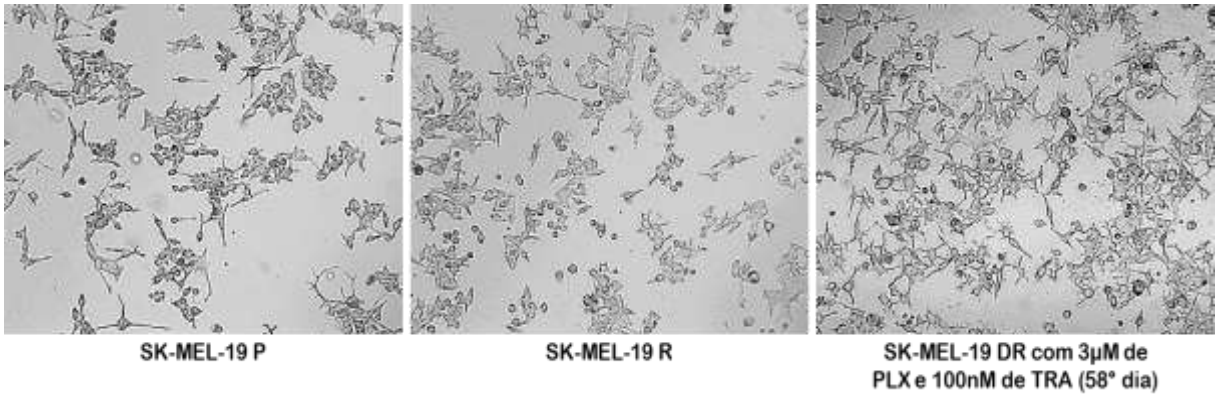
Figura 9. Fotomicrografia da linhagem SK-MEL-28 DR gerada pelo projeto



Fonte: Autoria própria. Linhagem SK-MEL-28 DR tratada com 6 µM de Vemurafenibe e 50 nM de Trametinibe. Aumento de 400x.

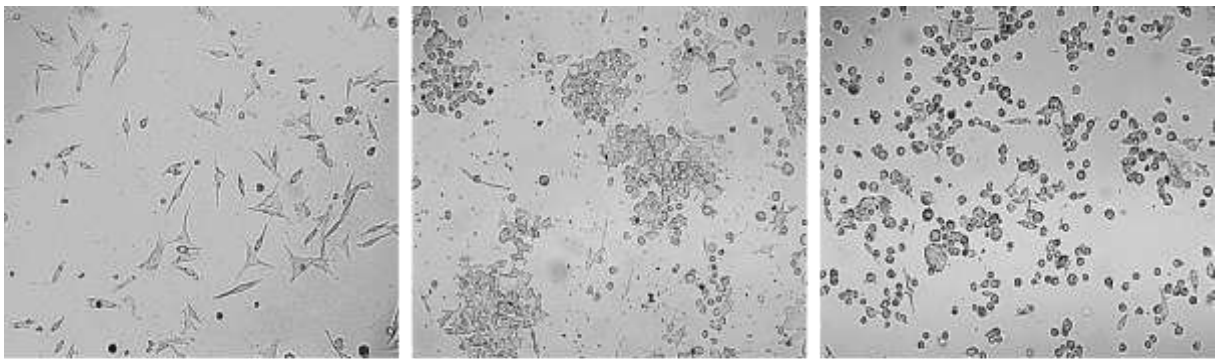
A linhagem SK-MEL-19 não apresentou grandes diferenças na morfologia durante o processo de geração da resistência ao trametinibe (Figura 10), mas demonstrou alta sensibilidade desde os primeiros tratamentos com o inibidor de MEK, apresentando muitas células mortas e demora na recuperação da proliferação (Figura 11). Além disso, as culturas apresentaram ainda grande quantidade de restos celulares e *debris* durante este processo (Figura 12). Por estas razões, foram necessários vários dias (~60 dias) para até a geração da linhagem resistente ao vemurafenibe (3 µM) e trametinibe (100 nM) (Figura 13).

Figura 10. Comparação da morfologia entre as diferentes linhagens de SK-MEL-19 P, R e DR



Fonte: Autoria própria. Linhagens SK-MEL-19 parental (P), resistente (R) e duplo-resistente (DR). Aumento de 100x.

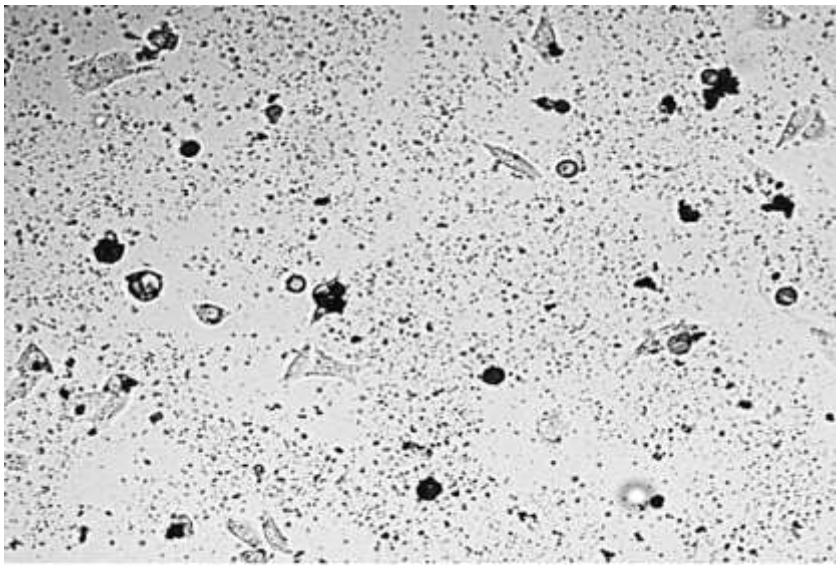
Figura 11. Geração da dupla-resistência da linhagem SK-MEL-19



SK-MEL-19 R tratada com 10nM de TRA | SK-MEL-19 R tratada com 30nM de TRA (41° dia) | SK-MEL-19 R tratada com 100nM de TRA (55° dia)

Fonte: Autoria própria. SK-MEL-19 R no início do tratamento com 10nM de trametinibe (TRA); SK-MEL-19 R com concentração de trametinibe de 30nM no 41°dia (2 dias após alteração da concentração de TRA); SK-MEL-19 R com concentração de 100nM no 55°dia (2 dias após a alteração da concentração de TRA). Aumento de 100x.

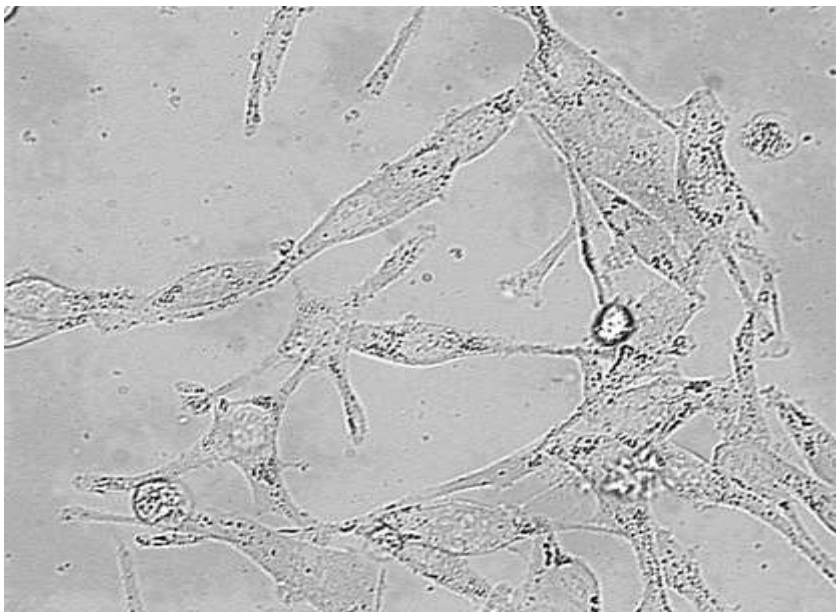
Figura 12. Demonstração da sensibilidade da linhagem SK-MEL-19 na geração da duplo-resistência



SK-MEL-19 R tratada com 10nM de TRA (37° dia)

Fonte: Autoria própria. Presença de restos celulares, *debris* e crescimento lento observado durante o processo de geração de dupla-resistência (37° dia) da linhagem SK-MEL-19. Aumento de 100x

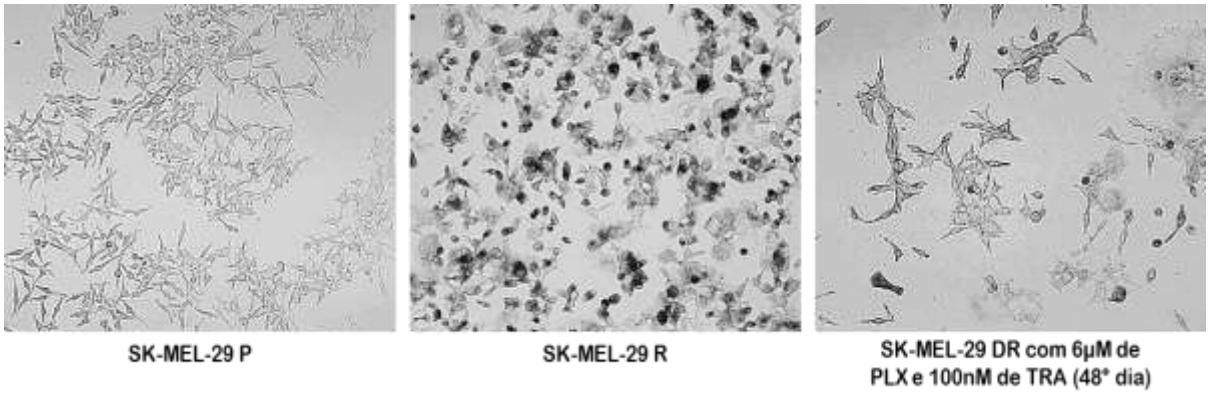
Figura 13. Fotomicrografia da linhagem SK-MEL-19 DR gerada pelo projeto



Fonte: Autoria própria. Aumento de 400x

A linhagem SK-MEL-29 R já demonstrava alterações morfológicas em relação ao seu tamanho quando comparada com a parental, como aconteceu com a SK-MEL-28 R (Figura 14). Após 48 dias a linhagem foi considerada duplo-resistente aos inibidores de BRAF (vemurafenibe - 6 µM) e de MEK (trametinibe - 100nM) (Figura 15), porém apresentou alta sensibilidade desde os primeiros dias de tratamento (Figura 16) de modo similar à linhagem SK-MEL-19 R. A característica mais importante adquirida à esta linhagem após a resistência, que se acentuou com a dupla-resistência alcançada, foi o aumento da melanogênese, visível a olho nu em placas de cultura (Figura 17A) e em tubos cônicos durante as manutenções celulares (Figura 17B).

Figura 14. Comparação da morfologia entre as diferentes linhagens SK-MEL-29 (P, R e DR)

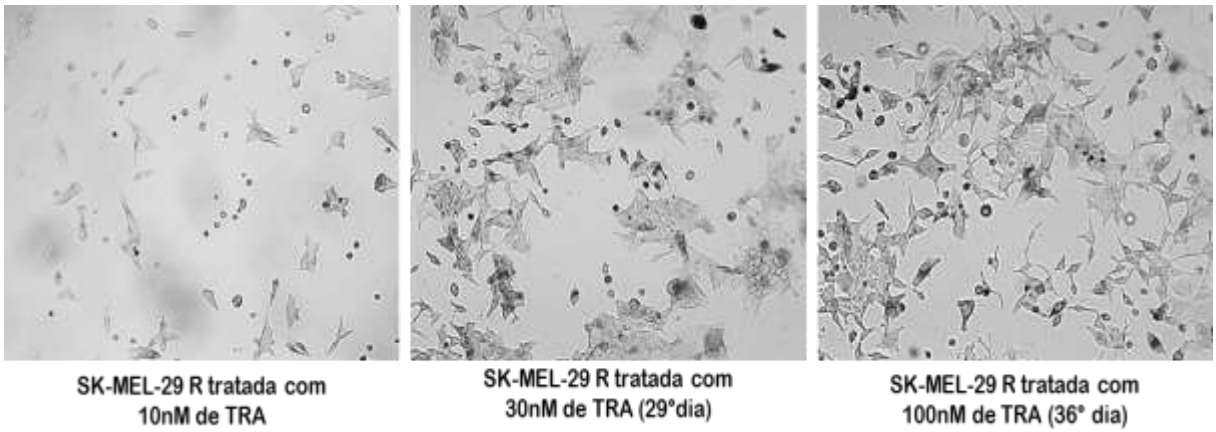


Fonte: Autoria própria. Linhagens SK-MEL-29 parental (P), resistente (R) e duplo-resistente (DR). Aumento de 100x.

Figura 15. Fotomicrografia da linhagem SK-MEL-29 DR gerada pelo projeto

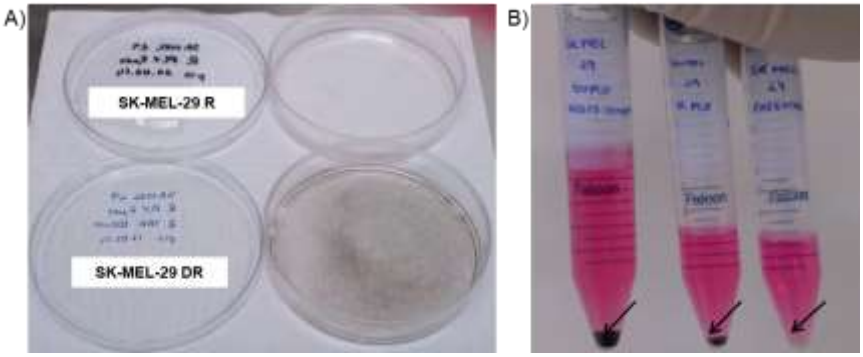
Fonte: Autoria própria. Aumento de 400x

Figura 16. Geração da dupla-resistência da linhagem SK-MEL-29



Fonte: Autoria própria. SK-MEL-29 R no início do tratamento com 10nM de trametinibe (TRA); SK-MEL-29 R com concentração de trametinibe de 30nM no 29°dia (2 dias após a alteração da concentração de TRA); SK-MEL-29 R com concentração de 100nM no 36°dia (2 dias após a alteração da concentração de TRA). Aumento de 100x.

Figura 17. Demonstração da diferença na produção de melanina entre as linhagens SK-MEL-29 (P, R e DR)

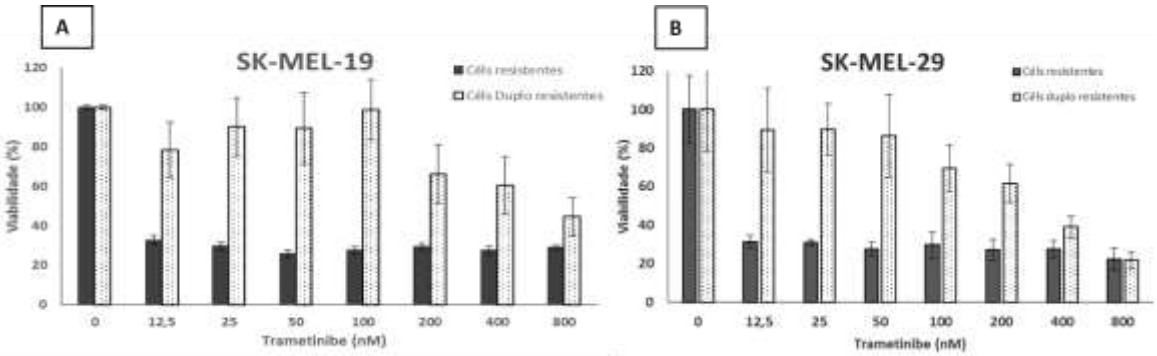


Fonte: Autoria própria. Linhagens SK-MEL-29 parental (P), resistente (R) e duplo-resistente (DR) observada em placas de cultura (A) e em tubos cônicos (B).

Para confirmar a dupla-resistência gerada com os inibidores de $BRAF^{V600E}$ e de MEK, foram realizados ensaios de citotoxicidade pelo método de MTT utilizando as linhagens resistentes ao vemurafenibe (3 µM para SK-MEL-19 e 6µM para SK-MEL-28 e SK-MEL-29) e as duplo-resistentes a ambos inibidores frente a diferentes concentrações de trametinibe (0; 12,5; 25, 50, 100, 200, 400 e 800 nM) por 72 horas. Para os controles negativos foram utilizados o meio D10 com o veículo DMSO (0,1%).

Para as linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29, nossos resultados de citotoxicidade também estão de acordo com o observado anteriormente no processo de geração da dupla-resistência adquirida (Figura 18 A e B).

Figura 18. Viabilidade comparada entre as células resistentes e duplo-resistentes



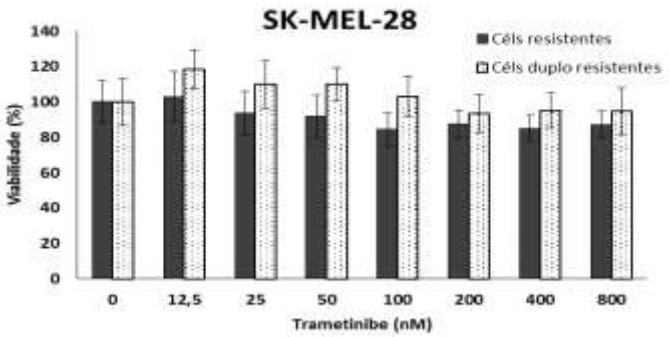
Fonte: Autoria própria. Foram utilizadas as linhagens SK-MEL-19 (A) e SK-MEL-29 (B) resistentes e duplo-resistentes frente a diferentes concentrações de trametinibe (0 – 800 nM) + vemurafenibe (3 e 6 µM respectivamente).

Ambas as linhagem SK-MEL-19 R e SK-MEL-29 R apresentaram significante sensibilidade desde a menor concentração dos inibidores de BRAF e MEK (vemurafenibe - 3 µM/6 µM e trametinibe - 12,5 nM), com viabilidade diminuída para aproximadamente 30% (Figura 18). Já as células SK-MEL-19 DR demonstraram viabilidade estável (~ 80-100%) até a concentração em que foi obtida a resistência ao trametinibe (100 nM); a partir da concentração de 200nM de trametinibe a viabilidade celular decresceu para 60%, alcançando a viabilidade de 45% na concentração de 800nM. A linhagem SK-MEL-29 DR demonstrou a existência de uma curva dose-resposta com viabilidade entre 90 e 22%, na menor e maior concentração respectivamente. Considerando as concentrações testadas, o IC_{50} das linhagens SK-MEL-19 R e SK-MEL-29 R foram menores do que 12,5 nM e significantemente diferente das linhagens duplo-resistente SK-MEL-19 DR (IC_{50}=

651 nM - p=0,0003) e SK-MEL-29 DR (IC_{50}= 461 nM - p< 0,0001), comprovando a duplo-resistência adquirida nesta primeira etapa do trabalho.

A linhagem SK-MEL-28 R já apresentava resistência intrínseca, como observado anteriormente no processo de geração da dupla-resistência, não sendo demonstrada sensibilidade ao trametinibe em nenhuma das concentrações utilizadas (Figura 19). A viabilidade das linhagens SK-MEL-28R e DR praticamente não foi reduzida (15%) nem na máxima concentração testada (800 nM), que é uma alta concentração para as linhagens sensíveis, dificultando assim, o cálculo do IC_{50}.

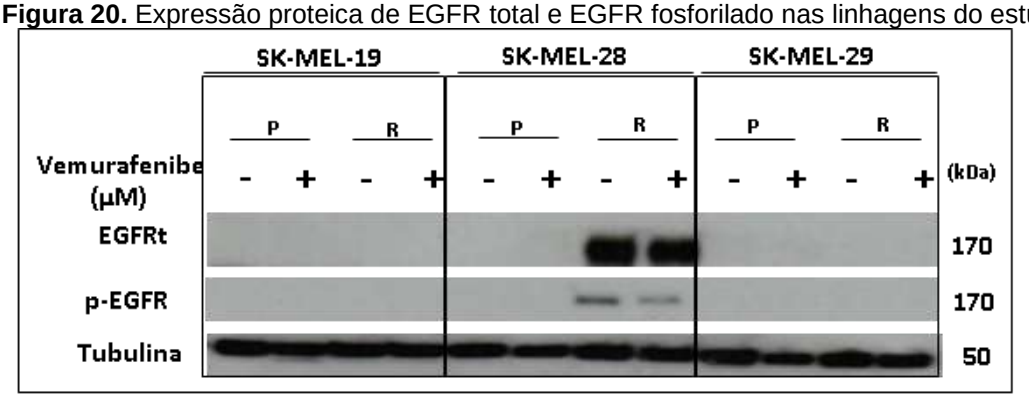
Figura 19. Viabilidade comparada entre as linhagens SK-MEL-28 resistentes e duplo-resistentes



Fonte: Autoria própria. As linhagens foram testadas frente a diferentes concentrações de trametinibe (0 – 800nM) + vemurafenibe (6µM)

Em virtude da observação de resistência para a linhagem SK-MEL-28 R, decidimos investigar se havia alteração na via de um receptor de MAPK (*Epidermal growth factor receptor* - EGFR) em linhagens parentais e resistentes que pudessem justificar esta resistência intrínseca ao tramentinibe. Desta forma, foram comparadas todas as linhagens do estudo parentais e resistentes na ausência e presença de vemurafenibe (Figura 20). É evidente a superexpressão proteica de EGFR total e fosforilado na linhagem SK-MEL-28 R em relação à sua parental e às outras linhagens, esclarecendo nossas dúvidas anteriores se havia indução deste receptor de tirosina quinase já na resistência alcançada ao vemurafenibe, contribuindo consequentemente com reativação da via MAPK e outras vias como a PI3K, e desta forma, justificando a resistência intrínseca ao trametinibe. Desta forma, estas linhagens não foram consideradas nas próximas etapas.

Figura 20. Expressão proteica de EGFR total e EGFR fosforilado nas linhagens do estudo



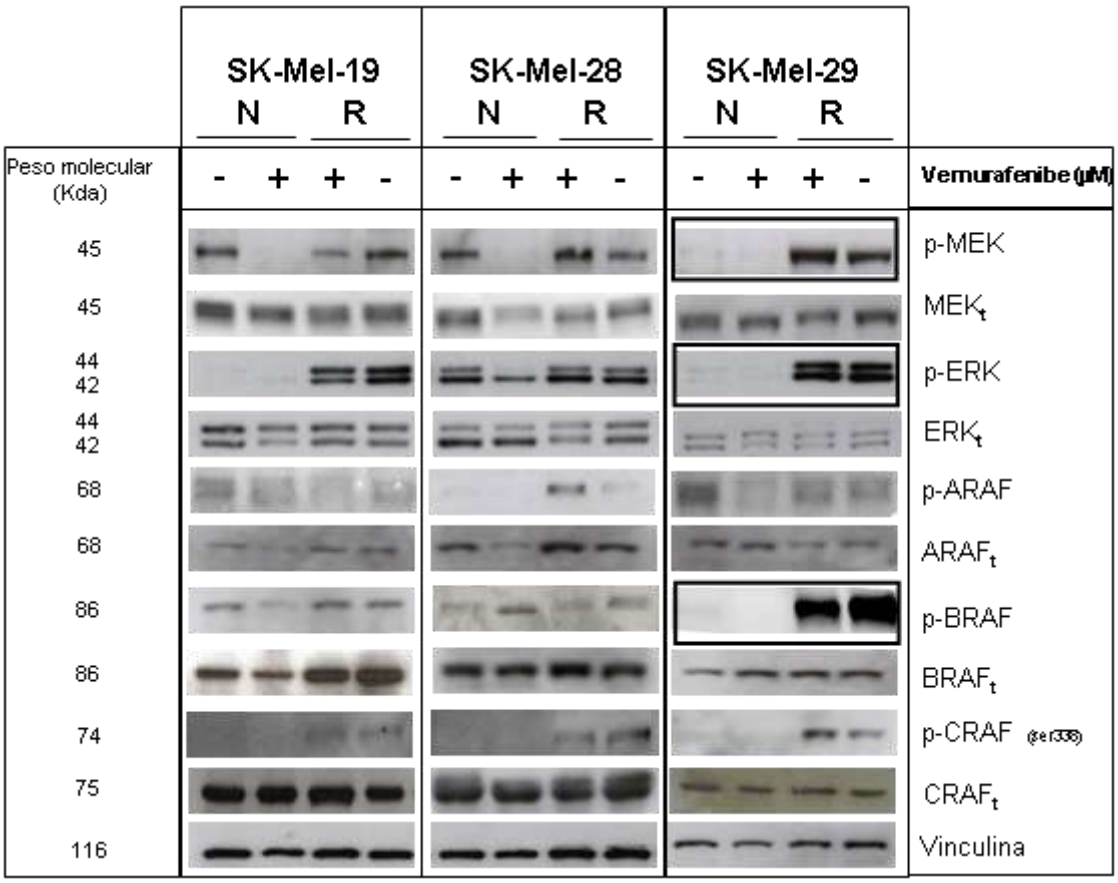
Fonte: Autoria própria. Western blotting para EGFR total (EGFRt) e EGFR fosforilado (p-EGFR) nas linhagens de melanoma SK-MEL-19, 28 e 29 parental (P) e seus clones resistentes (R) na presença (+) ou ausência (-) do vemurafenibe (3 ou 6 µM). Tubulina foi utilizada como controle endógeno.

Em virtude da visualização de células menos proliferativas durante a primeira geração da dupla-resistência foram realizadas curvas de crescimento com o método de exclusão do azul de tripan com os tratamentos habituais aos quais as linhagens são expostas. As linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29 P, R e DR foram plaqueadas em três confluências diferentes ($1x10^4$, $3x10^4$ e $1x10^5$ células/poço) segundo Freshney (2005, p.348), o que permite um conhecimento específico de cada linhagem e o cálculo do tempo de dobramento celular (*doubling time*) em diferentes condições de cultura, tanto inibitórias e estimulatórias, como variações na concentração de nutrientes. As curvas de crescimento obtidas para cada uma das linhagens, demonstrando as fases *lag* e *log* (exponencial) das linhagens SK-MEL-19 P, R e DR e SK-MEL-29 P, R e DR foram realizadas (Apêndice A1 e 2), o que permite o cálculo do tempo de dobramento celular de cada linhagem. As figuras com o número de células obtidas (Apêndice A3 e 4) e as fotos (Apêndice A5) de cada uma das linhagens nas diferentes confluências e tempos (24, 48, 72 e 96h) estão no material suplementar. Com base nestes resultados, a concentração de $3x10^4$ células/mL foi escolhida para iniciar os ensaios de citotoxicidade avaliando o tratamento combinado com vemurafenibe, trametinibe e/ou 4-NC por um período de 24h (BROHEM et al., 2012).

A via MAPK é uma cascata de fosforilação com o objetivo de ativar ERK, que quando fosforilado pode se translocar para o núcleo e assim, regular vários fatores de transcrição levando a expressão de diversos genes (ROBERTS, DER, 2007), inclusive à proliferação celular. Lembrando que a reativação desta via é o principal mecanismo de resistência ao vemurafenibe já identificado (PARAISO et al., 2010;

APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011) e de MEK (SHI et al., 2014; WAGLE et al., 2104), nossos esforços iniciais foram concentrados na caracterização desta via de sinalização por ensaio de western blotting. O laboratório já havia padronizado este ensaio para tratamentos com vemurafenibe por 48h em linhagens parentais, visando a observação do efeito inibitório da proteína final da via MAPK (p-ERK – *ERK* fosforilado) (Figura 21 – SANDRI et al., 2016).

Figura 21. Caracterização da expressão proteica dos marcadores da via MAPK nas linhagens do estudo

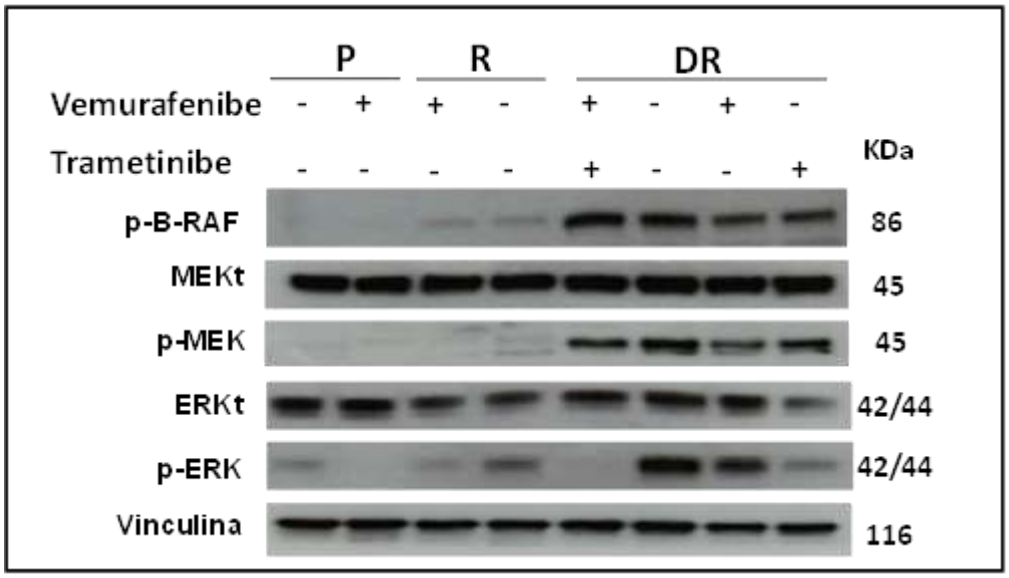


Western blotting com as linhagens de melanoma SK-MEL-19, SK-MEL-28 e SK-MEL-29 parentais (P) e resistentes (R), após 72 horas de cultura na presença (+) ou ausência (-) do vemurafenibe (3µM para SK-MEL-19 e 6 µM para SK-MEL-28 e SK-MEL-29). Vinculina foi utilizada como controle endógeno. Os quadros menores indicam a expressão de p-MEK, p-ERK e p-BRAF aumentadas na linhagem SK-MEL-29 R. Dados do laboratório - figura adaptada de Sandri et al., 2016.

Os experimentos foram iniciados com a linhagem SK-MEL-29 por ser de fácil cultivo e manutenção, apresentando rápido crescimento em comparação com as outras linhagens. Foi realizada a avaliação de proteínas em seu estado inativo, MEKt e ERKt (MEK-total e ERK-total), e ativo sendo p-BRAF (phospho-BRAF), p-

MEK (phospho-MEK) e p-ERK. A proteína vinculina foi utilizada como controle endógeno (Figura 22).

Figura 22. Expressão proteica dos principais marcadores da via MAPK nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 (P, R e DR)



Fonte: Autoria própria. Western blotting para BRAF fosforilado (p-BRAF), MEK total (MEKt), MEK fosforilado (p-MEK), ERK total (ERKt) e ERK fosforilado (p-ERK) em linhagens parental (P) e seus clones resistentes (R) e duplo-resistentes (DR) após 48 horas de cultura na presença (+) ou ausência (-) do vemurafenibe (6 μM) e/ou trametinibe (100nM). Vinculina foi utilizada controle endógeno. O tratamento com trametinibe foi utilizado apenas para a linhagem duplo-resistente.

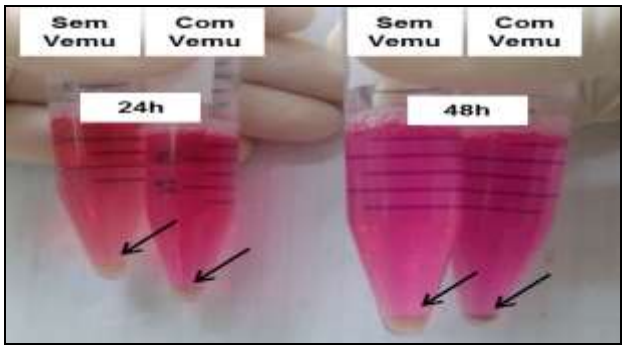
As proteínas totais, praticamente não apresentaram variações, enquanto as fosforiladas demonstraram diferentes variações na expressão dependendo da condição estabelecida, se parentais ou resistentes e na ausência ou presença dos tratamentos. A linhagem parental (P) não apresentou expressão da proteína p-BRAF na presença e na ausência de vemurafenibe. Acreditamos que não seja ausência de expressão de p-BRAF, mas em virtude de alta expressão das linhagens duplo-resistentes no mesmo filme, talvez não tenha sido detectada nas condições do ensaio. A linhagem resistente (R) demonstrou leve recuperação desta via em comparação com a linhagem duplo-resistente que apresentou alta expressão. A expressão de p-MEK apresentou comportamento similar com leve expressão nas linhagens parentais e resistentes, na ausência e presença de vemurafenibe, enquanto a linhagem duplo-resistente apresenta superexpressão. Conforme dados recentemente publicados pelo nosso grupo, a caracterização das linhagens parentais e resistentes (SK-MEL-19, SK-MEL-28 e SK-MEL-29) demonstra forte reativação da via MAPK na linhagem SK-MEL-29 R (Figura 21 – retirada do artigo do

grupo – SANDRI et al., 2016), o que não foi possível visualizar com clareza em nossos resultados em virtude da comparação com a linhagem duplo-resistente, mas está de acordo com nossos achados. Nossos dados ainda demonstram aumento na expressão para as linhagens duplo-resistentes.

De qualquer forma, mesmo que as linhagens demonstrem reativação de p-MEK e p-ERK, é nítido que o tratamento com vemurafenibe e/ou trametinibe tem efeito sobre a expressão destas proteínas, uma vez que na presença dos inibidores, a expressão é diminuída, até mesmo na linhagem duplo-resistente. Foi demonstrada leve expressão de p-ERK na linhagem parental na ausência de vemurafenibe e praticamente nula em sua presença. Um aumento na expressão de p-ERK na ausência do tratamento da linhagem resistente e da duplo-resistente foram observados apresentando forte reativação na ausência de ambos os tratamentos ou na presença apenas do vemurafenibe. A presença do trametinibe diminuiu a expressão de p-ERK e praticamente anulou sua expressão quando em tratamento combinado com vemurafenibe. A prática clínica atual descontinua uma dada terapia após a progressão da doença, porém já foi demonstrado que os inibidores de BRAF podem parcialmente suprimir a sinalização de ERK em certos tipos de resistência, sugerindo que manter o paciente com inibidor de BRAF enquanto se acrescenta um inibidor de MEK ou ERK, pode ser benéfico (CARLINO et al., 2013; SAMATAR & POULIKAKOS, 2014).

Para avaliar a padronização dos resultados com o ensaio de western blotting, outros tempos foram testados inicialmente com tratamentos por 24 e 48h, porém no momento da coleta das células para extração das proteínas foi identificado indícios de início de resistência com o período de 48h nas células parentais tratadas com vemurafenibe. Ao analisar a cor dos pellets celulares obtidos após a centrifugação, foi identificada uma coloração levemente mais escura nos tubos contendo as células tratadas com vemurafenibe por 48h, demonstrando um possível início de melanogênese (Figura 23). Como demonstrado anteriormente, a melanogênese foi a característica mais marcante adquirida para a linhagem SK-MEL-29 R e DR durante o processo de geração de resistência.

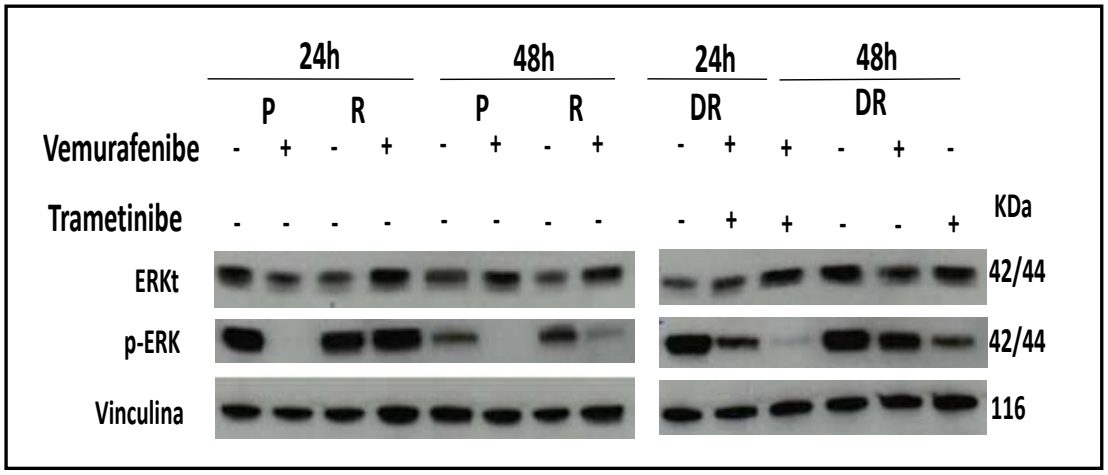
Figura 23. Visualização dos pellets celulares da linhagem SK-MEL-29 P no momento da extração de proteínas para o ensaio de western blotting



Fonte: Autoria própria. Nota. Os períodos utilizados foram tratamentos por 24 e 48h, na ausência ou presença do vemurafenibe. As setas pretas indicam os pellets observados em cada um dos tubos cônicos.

Na comparação entre os tempos de 24 e 48h, foi possível identificar a inibição de p-ERK já no período de 24h e presença de maior expressão desta proteína para todas as linhagens neste período. O padrão de expressão na presença de tratamento com vemurafenibe e/ou trametinibe se manteve, com exceção da linhagem R na presença de vemurafenibe por 24h que apresentou um aumento na expressão. Esta alteração pode ter ocorrido em virtude de maior aplicação de proteínas totais no poço, podendo ser observada através do controle endógeno vinculina (Figura 24).

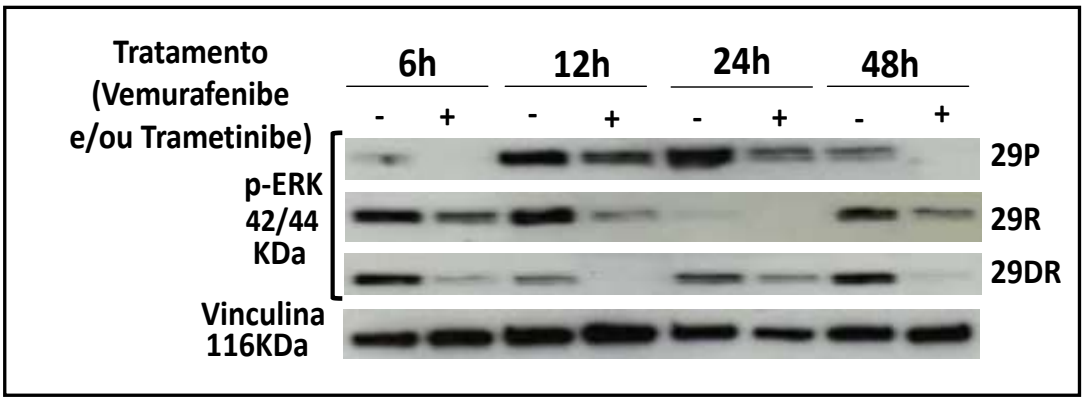
Figura 24. Expressão proteica dos marcadores p-ERK e ERKt nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 P, R e DR



Fonte: Autoria própria. Western blotting para ERK fosforilado (p-ERK) e ERK total (ERKt) nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 parental (P) e seus clones resistentes (R) e duplo-resistentes (DR), após 24 e 48 horas de cultura na presença (+) ou ausência (-) do vemurafenibe (6 μM). O tratamento com trametinibe (100 nM) foi utilizado apenas na linhagem duplo-resistente. Vinculina foi utilizada como controle endógeno.

Tendo em vista que no período de 24h já foi demonstrada a inibição de p-ERK na linhagem parental, foi decidido testar tempos inferiores a 24h (6, 12, 24 e 48h) e novamente foram observadas variações na expressão de p-ERK entre os tempos diferentes (Figura 25). O efeito mais importante observado foi a inibição de p-ERK após 6h de tratamento com vemurafenibe. Nos tempos de 12 e 24 há diminuição neste nível de expressão na presença do inibidor de B-RAF, porém ainda há expressão.

Figura 25. Expressão proteica do marcador p-ERK nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 P, R e DR



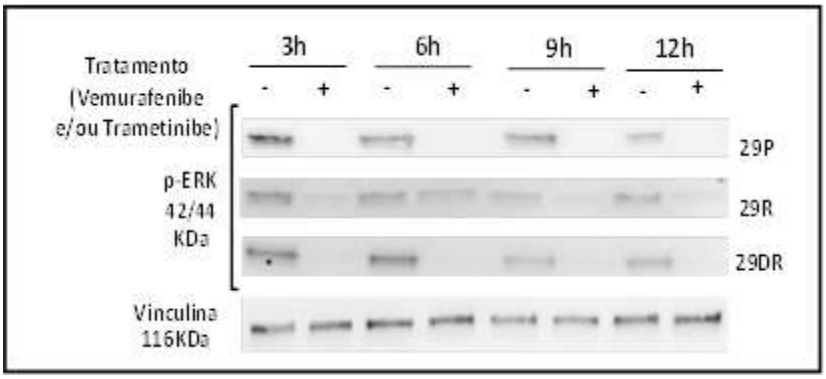
Fonte: Autoria própria. Western blotting para ERK fosforilado (p-ERK) nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 parental (P) e seus clones resistentes (R) e duplo-resistentes (DR), após 6, 12, 24 e 48 horas de cultura na presença (+) ou ausência (-) do vemurafenibe (6 μM) e/ou trametinibe (100nM). Vinculina foi utilizada como controle endógeno. O tratamento com trametinibe foi utilizado apenas para a linhagem duplo-resistente.

Analisando a expressão das linhagens resistentes e duplo-resistentes, a variação de p-ERK se mantém, apresentando superexpressão na ausência do inibidor e expressão diminuída em sua presença. Porém, como nosso objetivo era identificar o melhor tempo de tratamento para caracterização das linhagens geradas sem a indução de resistência nas linhagens parentais, decidimos avaliar tempos menores que 12h e utilizar o tempo mínimo que demonstre a primeira resposta ao tratamento com o inibidor de BRAF.

Nesta última etapa foram comparados os tratamentos realizados nos períodos de 3, 6, 9 e 12h. A figura 26 demonstra que todos os tempos testados apresentaram o efeito esperado com tratamento de vemurafenibe na linhagem SK-MEL-29 parental. O experimento foi repetido e seu resultado confirmado, resultando na escolha do período de 3h de tratamento para os ensaios de western blotting, o qual foi possível comparar as respostas obtidas com as linhagens parentais, resistentes e

duplo-resistentes (Figura 27). Foram analisadas as principais proteínas da via MAPK, sendo elas ARAF total (ARAFt), p-BRAF, phospho-CRAF (p-CRAF Ser259), MEKt, p-MEK, ERKt e p-ERK para identificação da via de resistência das linhagens duplo-resistentes. As proteínas fosfo-ARAF (p-ARAF), BRAF total (BRAFt), CRAF total (CRAFt), fosfo-CRAF (p-CRAF Ser338 e Ser289/296/301) também foram analisadas, mas as bandas não apareceram no gel, portanto não foram consideradas em nossa análise.

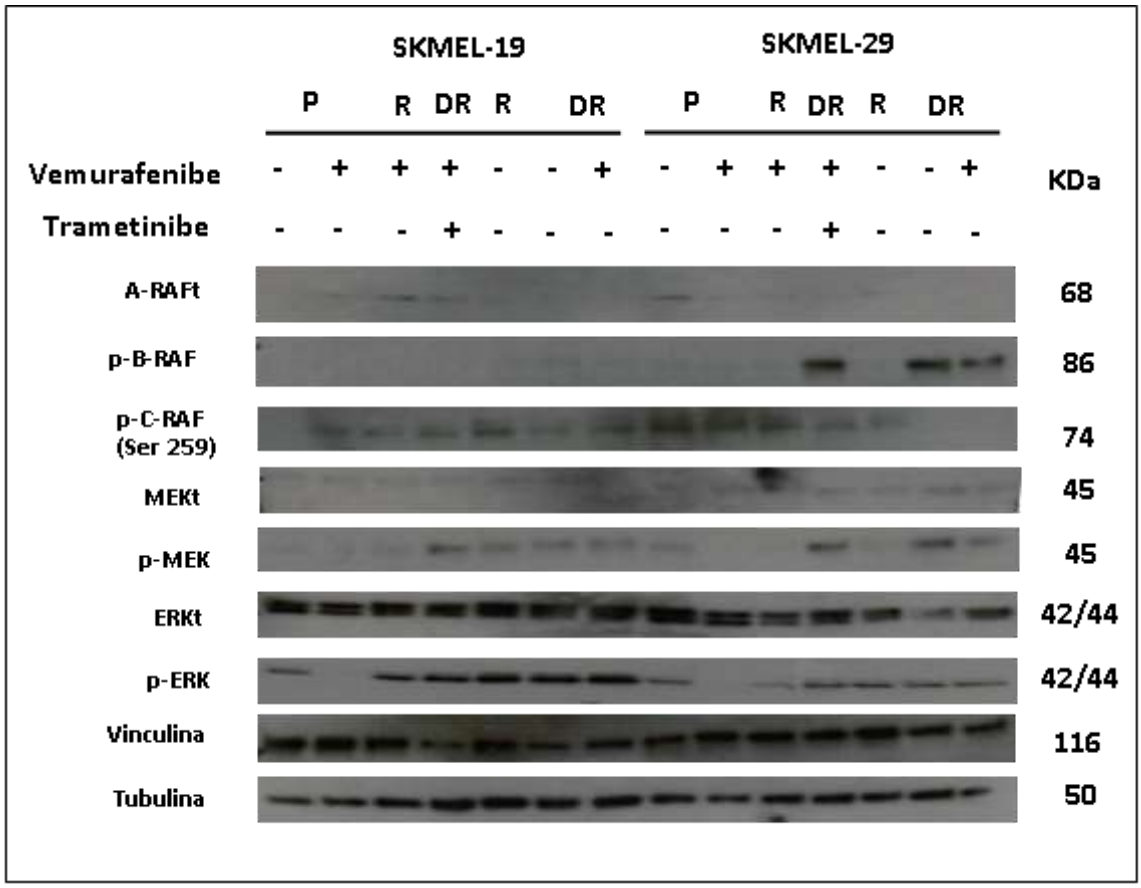
Figura 26. Expressão proteica do marcador p-ERK nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 P, R e DR



Fonte: Autoria própria. Western blotting para ERK fosforilado (p-ERK) nas linhagens de melanoma SK-MEL-29 parental (P) e seus clones resistentes (R) e duplo-resistentes (DR), após 3, 6, 9 e 12 horas de cultura na presença (+) ou ausência (-) do vemurafenibe (6 μM) e/ou trametinibe (100 nM). Vinculina foi utilizada como controle endógeno. O tratamento com trametinibe foi utilizado apenas para a linhagem duplo-resistente.

É nítida a reativação da via MAPK para as linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29 quando se tornaram resistentes e um leve aumento nesta expressão proteica quando se tornaram duplo-resistentes, evidenciada pela expressão de fosfo-ERK no período de 3 horas de tratamento com vemurafenibe e trametinibe (Figura 27). Este resultado já era esperado uma vez que muitos trabalhos demonstram esta via como o principal mecanismo de resistência aos inibidores de BRAF (PARAISO et al., 2010; APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011) e de MEK (SHI et al., 2014; WAGLE et al., 2014).

Figura 27. Caracterização da expressão proteica dos marcadores da via MAPK nas linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29 P, R e DR



Fonte: Autoria própria. Western blotting com as linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29 comparando parentais (P), seus clones resistentes (R) e duplo-resistentes (DR) após 3 horas de cultura na presença (+) ou ausência (-) de vemurafenibe (3µM para SK-MEL-19 e 6 µM para SK-MEL-29) e/ou trametinibe (100 nM). O tratamento com trametinibe foi utilizado apenas para a linhagem duplo-resistente. Via MAPK: ARAF total (ARAFt), fosfo-BRAF (p-BRAF), fosfo-CRAF (p-CRAF Ser259), MEK total (MEKt), fosfo-MEK (p-MEK), ERK total (ERKt) e fosfo-ERK (p-ERK). Vinculina e tubulina foram utilizadas como controle endógeno.

Dentre as proteínas analisadas, a linhagem SK-MEL-29 DR apresentou reativação da via a partir de B-RAF, demonstrando alta expressão de p-BRAF e p-MEK em relação às suas linhagens parental e resistente. Isso nos permite acreditar que esta linhagem pode ser resistente aos inibidores vemurafenibe e trametinibe por alterações na própria proteína BRAF ou em proteínas *upstream* da via como em RAS ou receptores de tirosina quinase (RTK) confirmando nossos dados de padronização. Outras vias de sinalização podem também estar alteradas como PI3K que não foram analisadas nesta etapa.

Diferente comportamento foi observado para a linhagem SK-MEL-19, embora também apresente reativação da via MAPK. Aumento de p-MEK foi evidenciado nas

linhagens duplo-resistente e resistente na ausência de vemurafenibe, demonstrando o efeito do inibidor mesmo quando a linhagem já é considerada resistente. Contudo, não foi possível identificar um aumento na expressão de p-BRAF, o que possivelmente demonstra um mecanismo de resistência diferente da linhagem SK-MEL-29, talvez por aumento na expressão de p-CRAF ou p-ARAF, mas nossos dados não nos permitiram esta conclusão.

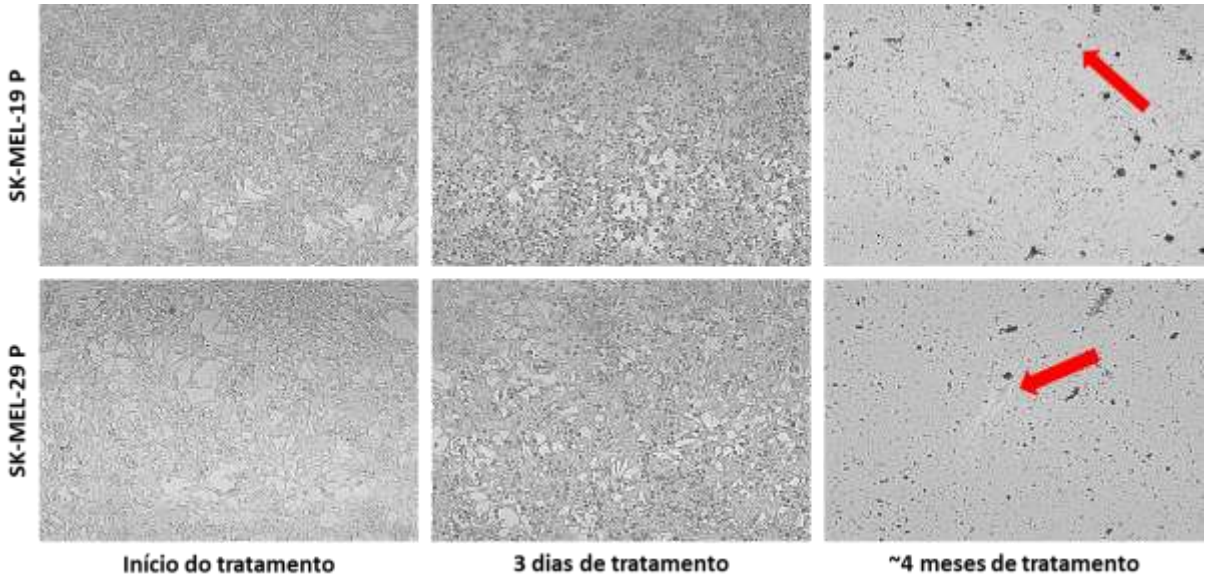
Estes resultados confirmam a resistência alcançada aos inibidores de BRAF e de MEK por reativação da via MAPK nestas linhagens de melanoma, mas o tratamento combinado tem demonstrado pouca eficácia clínica quando utilizado como medicamento de segunda linha para pacientes que já tiveram tratamento com inibidores de BRAF (vemurafenibe ou dabrafenibe) (JOHNSON et al., 2014). Desta forma, a FDA aprovou em novembro de 2015 a terapia combinatória com inibidores de BRAF e MEK (dabrafenibe + trametinibe) apenas para pacientes que nunca receberam tratamentos prévios com inibidores de BRAF, o que nos levou a geração de novas linhagens duplo-resistentes a partir de células parentais, ou seja, nunca exposta aos inibidores de BRAF, como acontece na prática clínica atual. De qualquer forma, todas as etapas anteriores foram essenciais na padronização e realização dos próximos experimentos.

5.1.2 Geração e caracterização da nova plataforma de células de melanoma humano duplo-resistentes aos inibidores B-RAF/MEK a partir de linhagens parentais

As linhagens parentais foram tratadas com concentrações crescentes da terapia combinatória (inibidores de BRAF e MEK) utilizada na clínica. Conforme observado na primeira etapa de geração das linhagens duplo resistentes a partir de linhagens resistentes ao vemurafenibe, as linhagens SK-MEL-19 P e SK-MEL-29 P também demonstraram enorme sensibilidade desde a menor concentração do tratamento combinado (vemurafenibe 0,5 μM e trametinibe 5 nM), apresentando muitas células mortas logo ao início do tratamento. As poucas células vivas restantes produziram enorme quantidade de debris e síntese de proteínas extracelular que cobrem o fundo da placa funcionando, possivelmente, como proteção para estas células (Figura 28). Este processo se prolongou por meses (~4

meses), o que dificultou muito a geração destas novas duplo-resistentes com estas linhagens. O procedimento foi repetido várias vezes e os resultados se confirmaram.

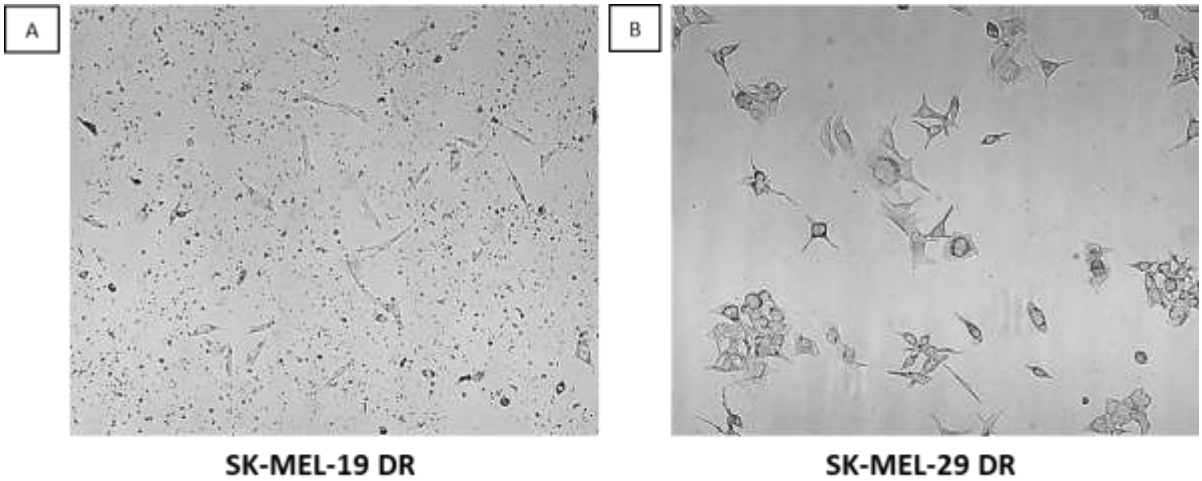
Figura 28. Processo de geração da dupla-resistência das linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29



Fonte: Autoria própria. Linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29 no início do tratamento, 3 dias após o início com o tratamento combinado contendo 0,5 µM de vemurafenibe e 5 nM de trametinibe e aproximadamente 4 meses após o início do tratamento. Aumento de 100x.

Embora as linhagens SK-MEL-19 DR (Figura 29 A) e SK-MEL-29 DR (Figura 29 B) tenham respondido aos tratamentos, sendo possível alcançar a duplo-resistência ao tratamento combinatório com os inibidores de BRAF (3 e 6 µM de vemurafenibe) e MEK (50 nM de trametinibe), esta geração foi muito demorada (6-8 meses), o que dificultou a utilização nestas linhagens nas próximas etapas do estudo.

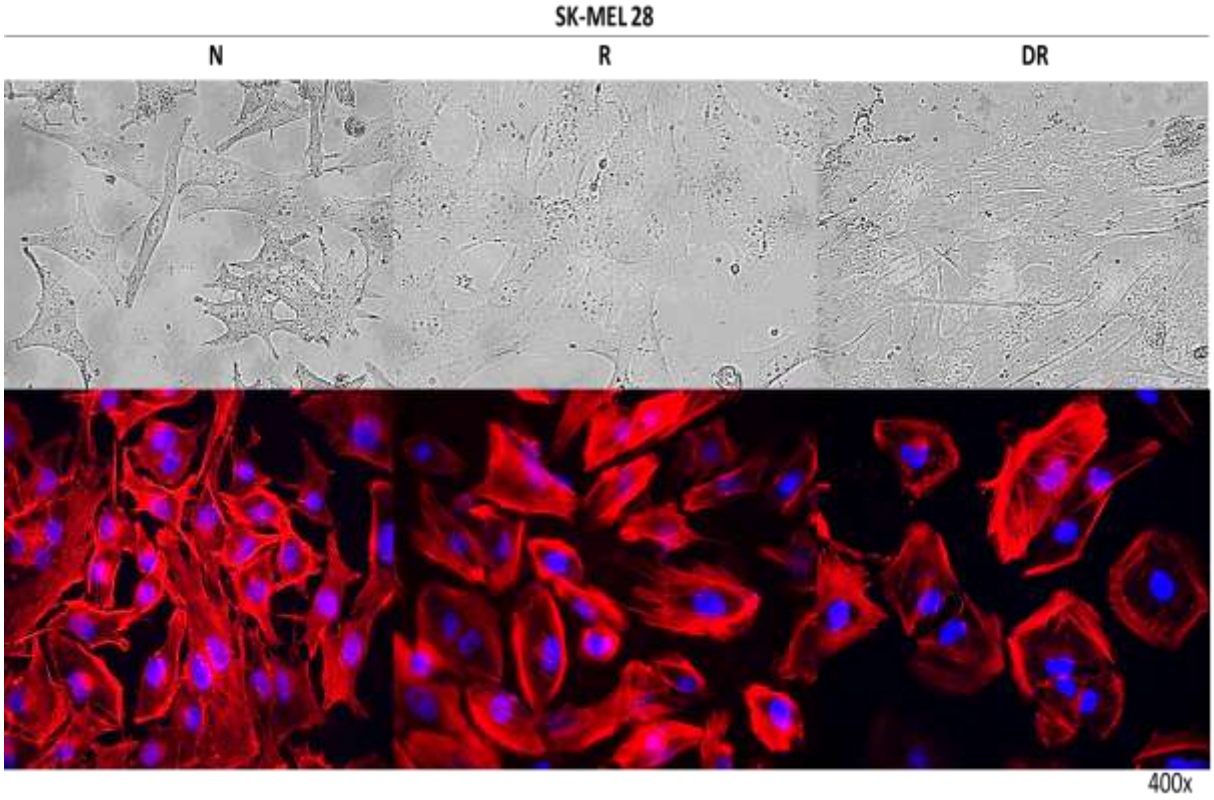
Figura 29. Processo de geração da dupla-resistência das linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29



Fonte: Autoria própria. Recuperação das linhagens SK-MEL-19 (A) SK-MEL-29 (B) após aproximadamente 4 meses de tratamento com tratamento combinado (0,5 μM de vemurafenibe e 5 nM de trametinibe). Aumento de 100x.

Muita dificuldade também foi enfrentada com a geração da linhagem SK-MEL-28 DR, apresentando muitas células mortas desde o início do tratamento, porém, aproximadamente após 90 dias, a linhagem duplo-resistente (tratamentos combinados de 6 μM de vemurafenibe + 50 nM de trametinibe) foi gerada com sucesso. Muitas características, como por exemplo, a diferença entre a morfologia das três linhagens, foram compartilhadas com esta nova linhagem SK-MEL-28 DR (Figura 30). As imagens obtidas com microscópio de contraste de fase (400 x) e de imunofluorescência (400 x) ressaltam as alterações principalmente no tamanho celular e estrutural do citoesqueleto, evidenciada pelas marcações de Faloidina/Rodamina, demonstrando a expressão de filamentos de actina, e de DAPI que se liga ao DNA demonstrando o contraste nuclear. Não foi possível a realização da quantificação e comparação da expressão de filamentos de actina entre as 3 linhagens em virtude de a expressão ser tão exacerbadamente diferente que impossibilitava a obtenção das fotos com o mesmo tempo de exposição à fluorescência (SK-MEL-28 P - 1 s, SK-MEL-28 R - 800 ms e SK-MEL-28 DR – 200 ms). Esta diferença pode ser atribuída às alterações na autofluorescência celular gerada com o duplo tratamento, mas as imagens demonstram filamentos de actina mais longos nas células resistentes e duplo-resistentes quando comparados com as parentais.

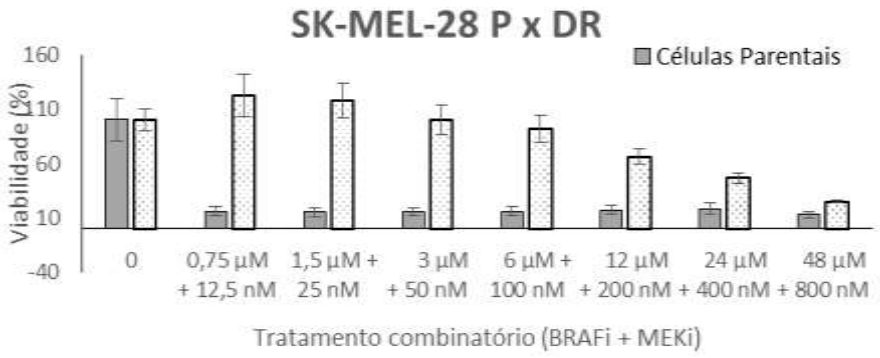
Figura 30. Caracterização microscópica da morfologia diferencial entre as linhagens SK-MEL-28 P, R e DR



Fonte: Autoria própria. Imagens obtidas com microscopia ótica de contraste de fase (Aumento de 400 x) e de Fluorescência (Aumento de 400 x) para as marcações de Faloidina/Rodamina e DAPI.

A dupla-resistência foi confirmada também por ensaio de MTT no qual a linhagem parental demonstrou viabilidade diminuída para 16% desde a primeira concentração utilizada nos tratamentos combinados (0,75 μM de vemurafenibe e 12,5 nM de trametinibe). As linhagens duplo-resistentes apresentaram valor de IC_{50} (30 μM de vemurafenibe e 490 nM de trametinibe), valor este muito superior ao IC_{50} da linhagem parental (< 0,75 μM de vemurafenibe e 12,5 nM de trametinibe). Os controles foram realizados tratando-se as células com meios regulares (6 μM de vemurafenibe e 100 nM de trametinibe), portanto a linhagem SK-MEL-28 DR apresentou viabilidade aumentada nas concentrações iniciais dos tratamentos provavelmente devido à baixa concentração dos inibidores presentes (Figura 31).

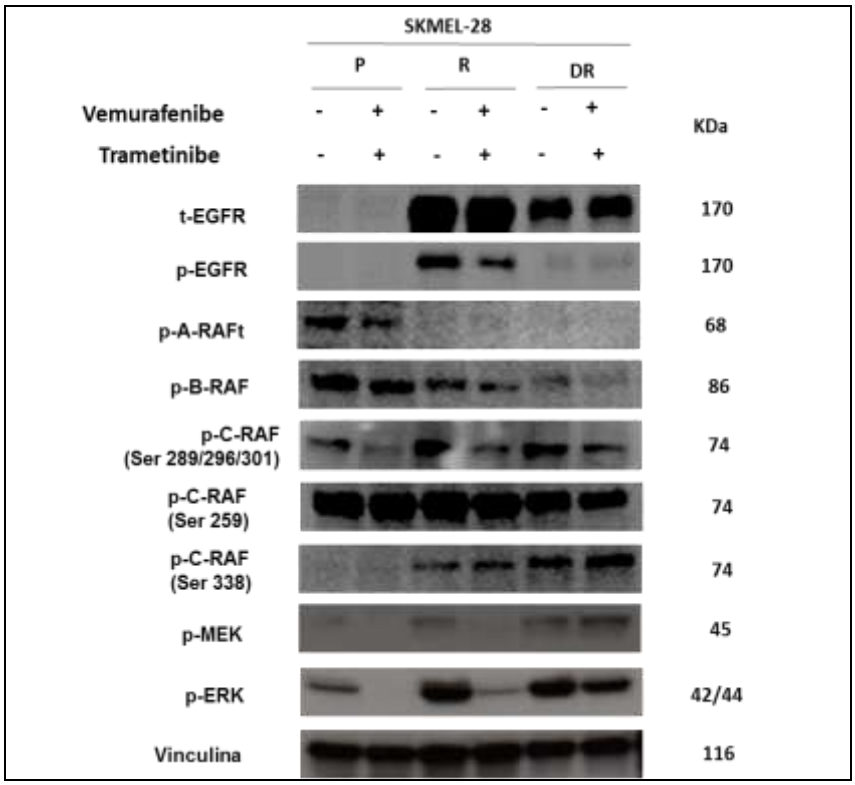
Figura 31. Confirmação da dupla-resistência da linhagem SK-MEL-28 DR



Fonte: Autoria própria. Viabilidade comparada entre as células parentais e duplo-resistentes da linhagem SK-MEL-28 frente a diferentes concentrações de vemurafenibe (0 - 6µM) e de trametinibe (0 – 800nM)

Novamente, a reativação da via MAPK foi demonstrada na resistência adquirida destas linhagens. Os tratamentos agudos (3 h) com ambos os inibidores diminuem a fosforilação de MEK e ERK, como já havia sido demonstrado para as linhagens SK-MEL-28 P e R na presença do vemurafenibe (SANDRI et al., 2016). Entretanto, a conquista da resistência aos inibidores de BRAF e de MEK demonstram aumento na expressão na fosforilação de elementos da cascata de proteínas da via MAPK. Esta reativação é acompanhada pelo aumento de expressão p-CRAF, t-EGFR e p-EGFR, embora os receptores de tirosina quinase apresentem expressão diminuída na SK-MEL-28 DR quando comparada a SK-MEL-28 R. As expressões proteicas de p-ARAF e p-BRAF diminuem nas células resistentes e duplo-resistentes, demonstrando um importante papel de p-CRAF no funcionamento desta via de sinalização (Figura 32). As características destas células estão totalmente de acordo com a literatura e demonstram sua relevância na utilização neste estudo com os experimentos de citotoxicidade e ainda em futuros estudos do nosso grupo.

Figura 32. Caracterização da expressão proteica dos marcadores da via MAPK nas linhagens SK-MEL-28 P, R e DR



Fonte: Autoria própria. Western blotting com a linhagem SK-MEL-28 comparando parentais (P), seus clones resistentes (R) e duplo-resistentes (DR) após 3 horas de cultura na presença (+) ou ausência (-) de vemurafenibe (6µM) e trametinibe (100 nM). Receptores de Tirosina quinase: total-EGFR e fosfo-EGFR (p-EGFR); Via MAPK: fosfo-ARAF (p-ARAF), fosfo-BRAF (p-BRAF), fosfo-CRAF (p-CRAF Ser 289/296/301, Ser259 e Ser338), fosfo-MEK (p-MEK), e fosfo-ERK (p-ERK). Vinculina foi utilizada como controle endógeno.

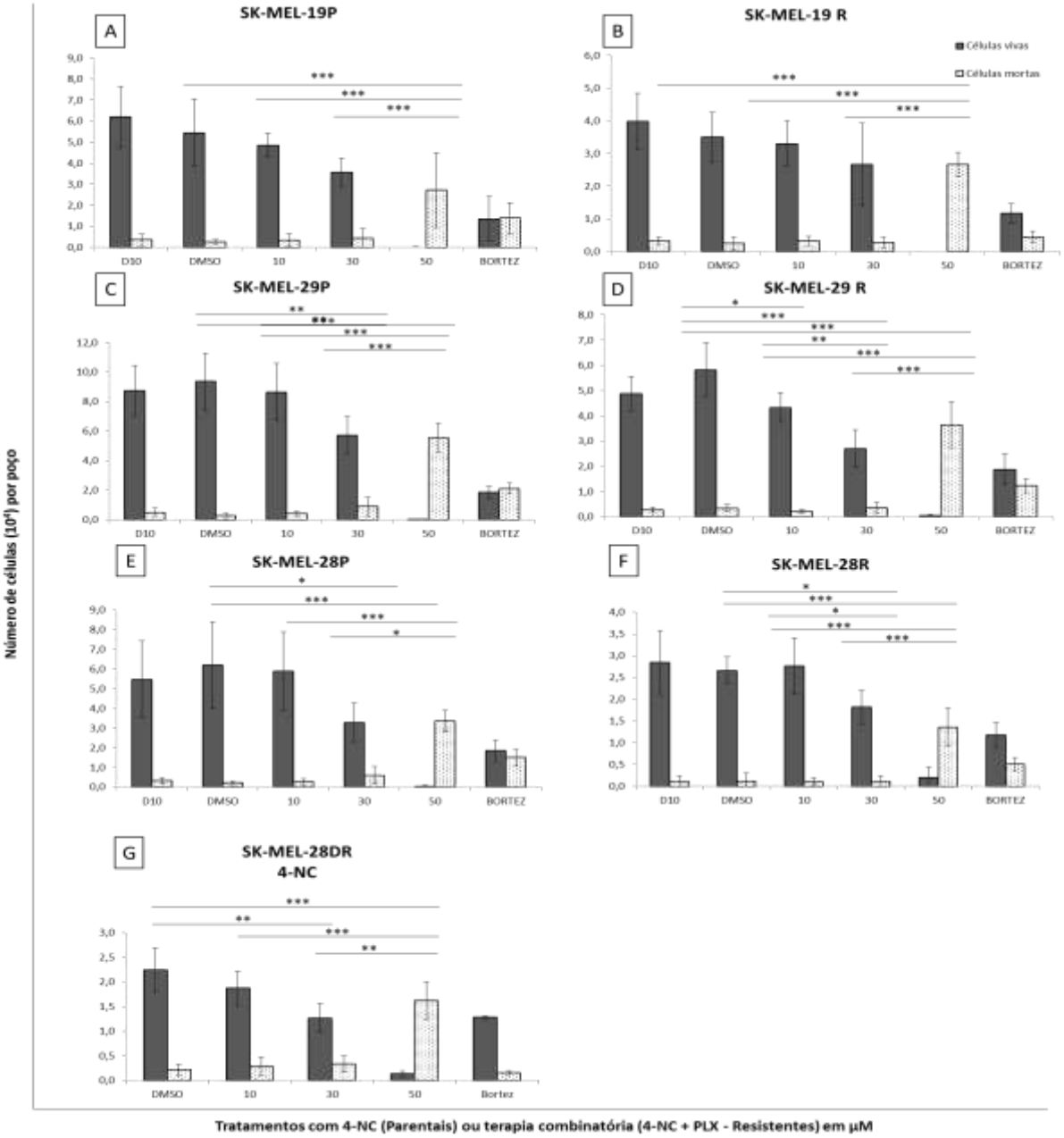
5.1.3 Avaliação da citotoxicidade com a terapia combinatória e/ou 4-NC

5.1.3.1 Avaliação da citotoxicidade utilizando 4-NC em linhagens parentais ou tratamento combinado em resistentes e duplo-resistentes

Nesta etapa foram realizados ensaios de citotoxicidade pelo método de exclusão do corante azul de tripan (conforme item 4.1.5.2) com as linhagens parentais (SK-MEL-19 P, SK-MEL-29 P e SK-MEL-28 P) tratadas com 4-NC, linhagens resistentes (SK-MEL 19 R, SK-MEL-29 R e SK-MEL-28R) e duplo-resistentes (SK-MEL-28 DR) tratadas com o tratamento combinado contendo vemurafenibe (PLX 3 ou 6 µM), trametinibe (50 nM) e 4-NC (10 – 50 µM). O Bortezomibe foi utilizado como controle positivo para comparação com um inibidor proteassomal já utilizado. As análises foram realizadas em função das médias de pelo menos dois experimentos independentes em triplicatas.

Tanto o tratamento apenas com 4-NC, quanto em combinação exerceram um significante efeito citotóxico concentração-dependente em todas as linhagens testadas para os tratamentos por 24h (Figura 33 A-G). Os controles foram realizados com DMSO na concentração de 0,5%, que foi a maior utilizada nestes experimentos. Na comparação entre as linhagens parentais e resistentes foram observados comportamentos muito diferentes apresentando valores de IC_{50} do 4-NC (figura 33 H) muito próximos como as linhagens SK-MEL-19 P e R (~29 µM), ou diferentes como as linhagens SK-MEL-29 P (29,1 µM) que demonstrou uma sensibilidade significantemente ($p=0,0395$) menor que sua linhagem resistente (25,3 µM). O inverso também foi observado, como com as linhagens SK-MEL-28, ao qual a parental (28,5 µM) e duplo-resistente (29 µM) demonstraram sensibilidade significantemente maior ($p<0,001$) ao tratamento do que sua resistente (33 µM). Segundo Brohem et al. (2009) o IC_{50} do 4-NC para a linhagem SK-MEL-28 P foi de 35 µM, o que difere dos resultados apresentados neste estudo, porém é importante lembrar que os controles foram com solventes (etanol e DMSO, respectivamente) e concentrações diferentes (0,1% e 0,5%, respectivamente).

Figura 33. Efeitos citotóxicos de 4-NC em linhagens SK-MEL-19, SK-MEL-29 e SK-MEL-28 P, R e DR



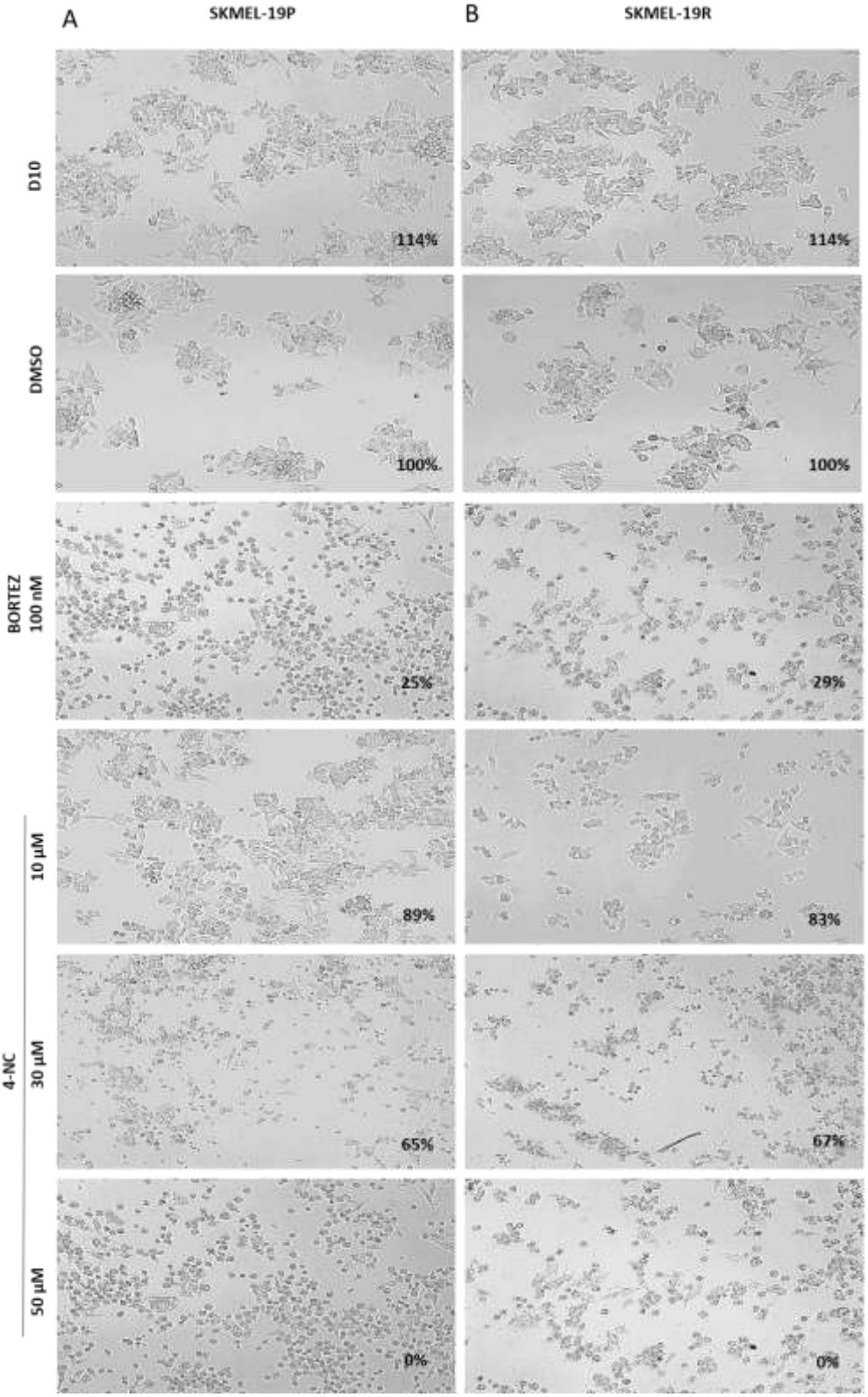
H

IC_{50} (4-NC µM)	N	R	DR
SK-MEL-19	29	29	-
SK-MEL-29	29	25	-
SK-MEL-28	28	33	29

Fonte: Autoria própria. Ensaio de exclusão do Azul de tripan em linhagens parentais [SK-MEL-19 P (A), SK-MEL-29 P (C) e SK-MEL-28 P (E)], resistentes [SK-MEL-19 R (B), SK-MEL-29 R (D), e SK-MEL-28 R (F)] e duplo-resistente [SK-MEL-28 DR (G)] de melanoma após tratamentos por 24h. Os controles foram tratados com D10, DMSO (0,5%) e Bortezomibe (100 nM). Os tratamentos com 4-NC (10, 30 e 50 µM) foram realizados para linhagens parentais e o tratamento combinado (PLX 3 ou 6 µM + 4-NC) para as células resistentes e duplo-resistentes (+ trametinibe 100 nM). Os tratamentos foram apresentados no eixo x e o número de células ($x10^4$) por poço/mL no eixo y. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ na comparação dos tratamentos com 4-NC com o controle DMSO. (H) Valores de IC_{50} (µM) do 4-NC calculados para cada uma das linhagens no período de 24h.

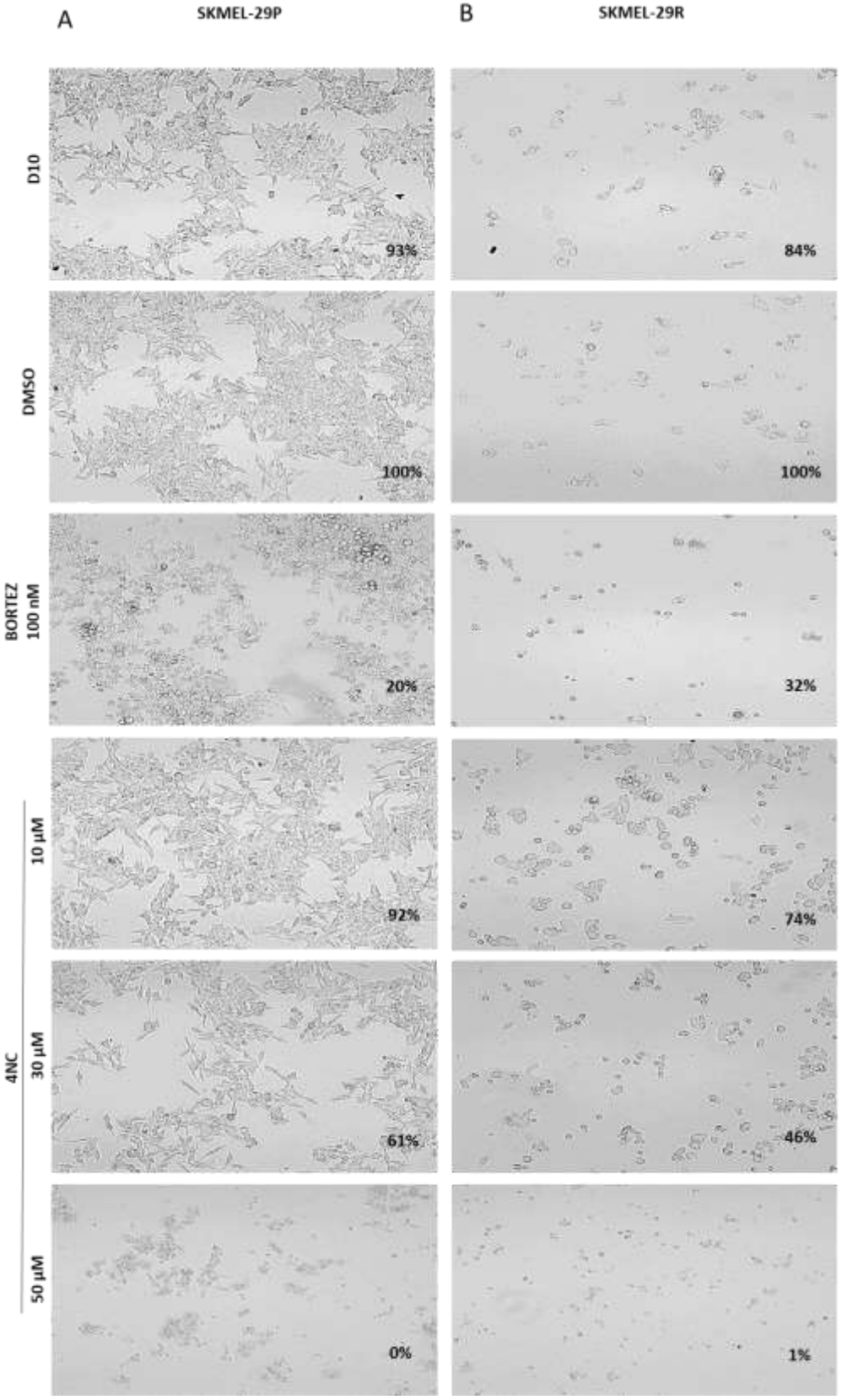
Não foram identificadas grandes variações concentração-dependente na morfologia, mas a diminuição no número de células foi evidente nos tratamentos a partir da concentração de 30 µM de 4-NC, em alguns casos apresentando muitas células mortas, como na linhagem SK-MEL-19 P (Figura 34A) e R (Figura 34B). Em tratamentos com a concentração de 50 µM de 4-NC as células apresentaram descolamento do fundo da placa resultando em grupos celulares de diversos tamanhos e muitas células mortas [Figuras 34 A e B (SK-MEL-19 P e R), 35 A e B (SK-MEL-29 P e R) e 36 A (SK-MEL-28 P)], exceto para a linhagem SK-MEL-28 R (Figura 36B) e SK-MEL-28 DR (Figura 37), demonstrando o importante papel citotóxico tanto em linhagens parentais quando administrado em tratamento isolado, quanto em linhagens resistentes e duplo-resistentes administrado em combinação com vemurafenibe e trametinibe. É bom ressaltar que o 4-NC demonstrou menor citotoxicidade em células normais, como fibroblastos apresentando IC_{50} de 50 µM (BROHEM et al., 2009) e não foi citotóxico na concentração de 30 µM para queratinócitos normais em modelo tridimensional de pele artificial (BROHEM et al., 2012). A SK-MEL-28 R e DR foram as linhagens que apresentaram menor sensibilidade em comparação com todas as outras, até mesmo com o Bortezomibe (100 nM), que demonstrou o mínimo efeito com esta linhagem apresentando 47% e 57% de viabilidade, respectivamente, enquanto as outras linhagens apresentaram entre 20 e 30%. A possível explicação seria a superativação de outras vias de sinalização, como é o caso da EGFR, que já foi identificada como superexpressa para esta linhagem e pode ser vantajoso para estas células na presença dos inibidores (SUN et al., 2014).

Figura 34. Efeitos citotóxicos de 4-NC na viabilidade da linhagem SK-MEL-19 P e R



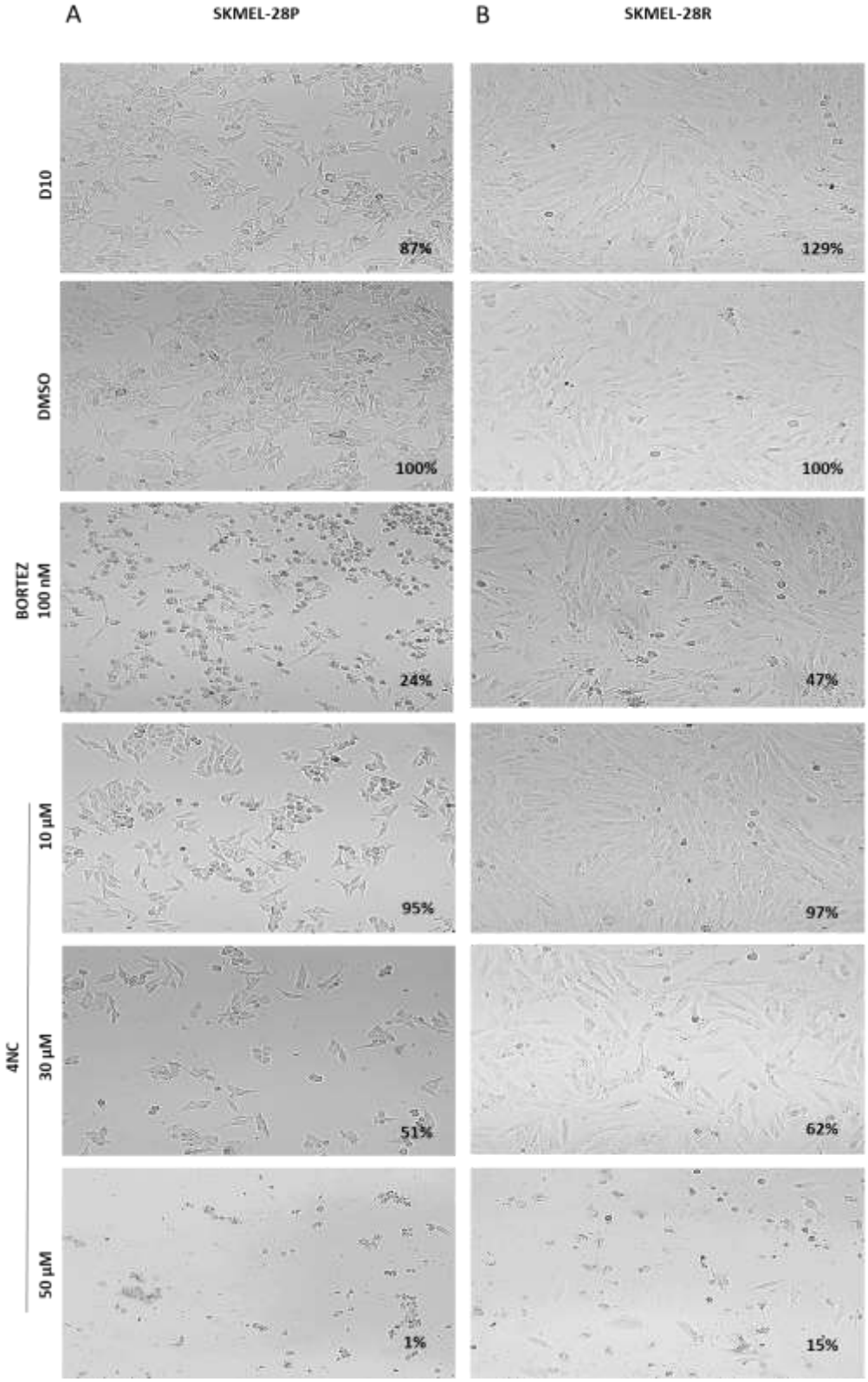
Fonte: Autoria própria. Linhagem de melanoma parental [SK-MEL-19 P (A)] e resistente [SK-MEL-19 R (B)] após tratamentos com D10, DMSO (0,5%) e 4-NC nas concentrações de 10, 30 e 50 µM dissolvidos em DMSO. A linhagem resistente foi tratada com tratamento combinado contendo também vemurafenibe (3 µM). As viabilidades foram demonstradas em cada tratamento. Aumento de 100x.

Figura 35. Efeitos citotóxicos de 4-NC na viabilidade da linhagem SK-MEL-29 P e R



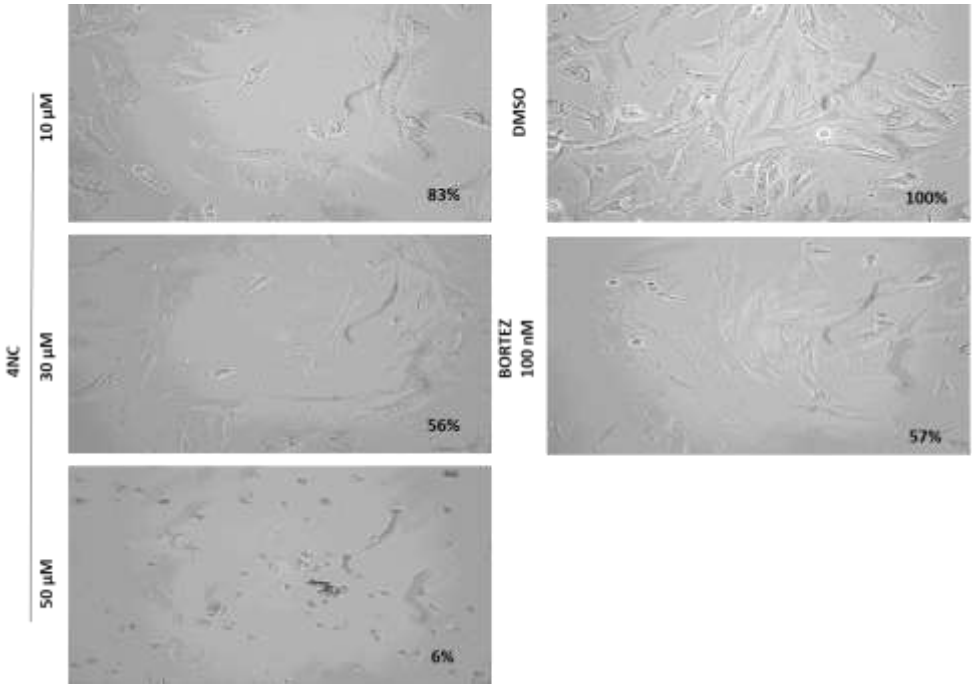
Fonte: Autoria própria. Linhagem de melanoma parental [SK-MEL-29 P (A)] e resistente [SK-MEL-29 R (B)] após tratamentos com D10, DMSO (0,5%) e 4-NC nas concentrações de 10, 30 e 50 µM dissolvidos em DMSO. A linhagem resistente foi tratada com tratamento combinado contendo também vemurafenibe (6 µM). As viabilidades foram demonstradas em cada tratamento. Aumento de 100x.

Figura 36. Efeitos citotóxicos de 4-NC na viabilidade da linhagem SK-MEL-28 P e R



Fonte: Autoria própria. Linhagem de melanoma parental [SK-MEL-28 P (A)] e resistente [SK-MEL-28 R (B)] após tratamentos com D10, DMSO (0,5%) e 4-NC nas concentrações de 10, 30 e 50 µM dissolvidos em DMSO. A linhagem resistente foi tratada com o tratamento combinado contendo também vemurafenibe (6 µM). As viabilidades foram demonstradas em cada tratamento. Aumento de 100x.

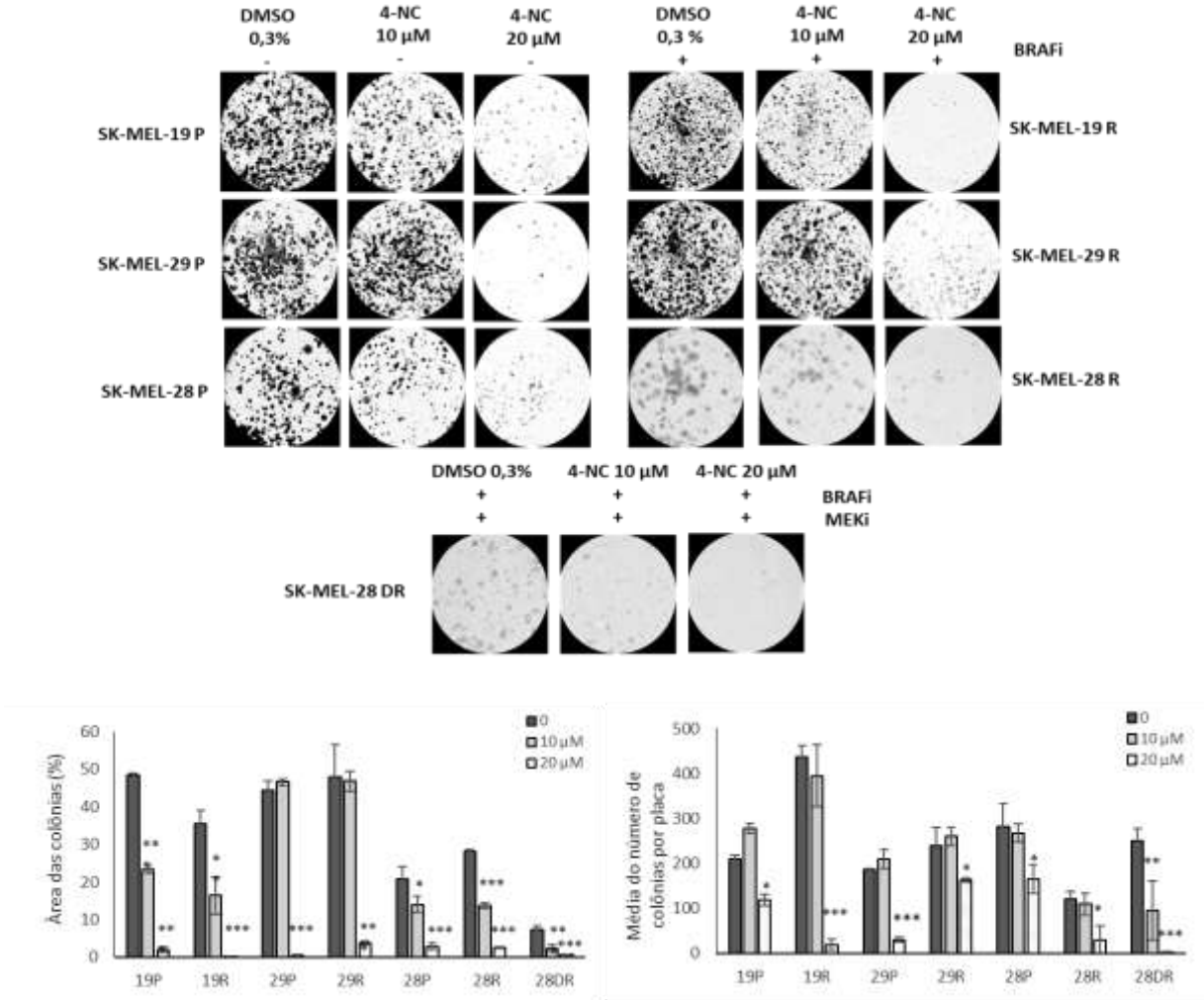
Figura 37. Efeitos citotóxicos de 4-NC na viabilidade da linhagem SK-MEL-28 DR



Fonte: Autoria própria. Linhagem de melanoma duplo-resistente (SK-MEL-28 DR) após tratamentos com tratamento combinado (vemurafenibe 6 µM + trametinibe 100 nM) contendo 4-NC nas concentrações de 10, 30 e 50 µM dissolvidos em DMSO ou DMSO (0,5%) para os controles. Bortezomibe (100 nM) foi utilizado como controle positivo. As viabilidades foram demonstradas em cada tratamento. Aumento de 100x.

Na avaliação da influência do tratamento com 4-NC na formação de colônias, tanto em uso isolado quanto em combinação com vemurafenibe (BRAFi) e trametinibe (MEKi) demonstrou efeito inibitório na formação de colônias da maioria das linhagens parentais, resistentes e duplo-resistente desde a menor concentração testada (10 µM) quando tratadas por um período de aproximadamente 2 semanas (Figura 38). Esta inibição ocorreu tanto na área das colônias quanto na média do número de colônias por poço. Algumas linhagens (SK-MEL-19 P, SK-MEL-29 P e R) apresentaram um leve aumento no número de colônias na concentração de 10 µM, porém a concentração de 20 µM de 4-NC em uso isolado ou em tratamento combinado foi eficaz para todas as linhagens, apresentando poucas colônias visíveis na placa de 6 poços.

Figura 38. Potencial de inibição na formação de colônias do 4-NC ou tratamento combinado nas linhagens do estudo



Fonte: Autoria própria. Linhagens utilizadas: SK-MEL-19 P, SK-MEL-19 R, SK-MEL-29 P, SK-MEL-29 R, SK-MEL-28 P, SK-MEL-28 R e SK-MEL-28 DR. Os tratamentos utilizados foram D10 contendo DMSO (0,2%) ou 4-NC (10 e 20 µM) para as linhagens parentais e D10 contendo DMSO (0,2%) + vemurafenibe (PLX 3 ou 6 µM) ou combinação com vemurafenibe (PLX 3 ou 6 µM) + 4-NC (10 e 20 µM) para as linhagens resistentes. A linhagem duplo-resistente foi tratada também com trametinibe (TRA – 100 nM). Imagens das colônias formadas no fundo da placa (A); Gráficos demonstrando a área das colônias e a média do número de colônias por placa (B). A média do número de colônias foram adquiridas com o auxílio do software Image J. *p<0,05 e ***p<0,001 na comparação entre os tratamentos com 4-NC e os controles DMSO.

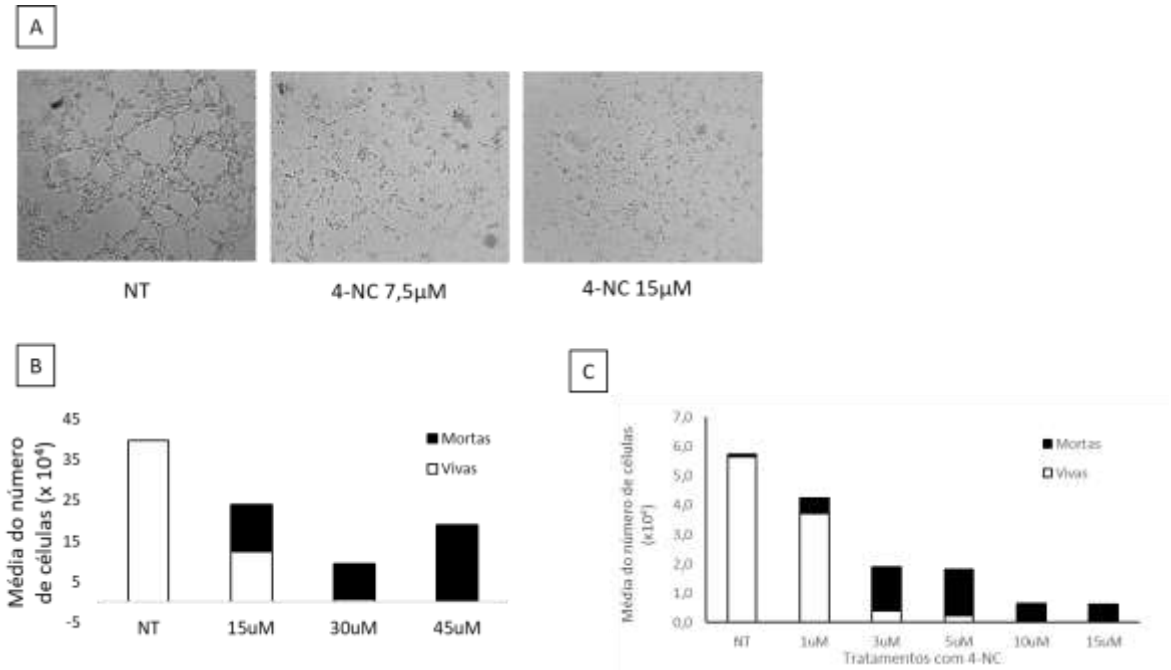
A SK-MEL-28 DR foi a única linhagem que apresentou significância com 10 µM de 4-NC, possivelmente por demonstrar as maiores diferenças entre as duas concentrações. Este ensaio avalia o potencial do tratamento com 4-NC na retenção da capacidade de duplicação celular, ou seja, na formação das células filhas, que pode ser causado por morte celular reprodutiva como resultado de dano aos cromossomos, apoptose, etc (BROWN & ATTARDI, 2005).

5.1.3.2 Investigação de efeito citotóxico na formação de tubos (Ensaio de Angiogênese)

O processo de angiogênese é necessário para progressão tumoral, pois os novos capilares serão utilizados para as trocas de gases e suplemento de nutrientes (CARMELIET & JAIN, 2000). Na ausência do desenvolvimento vascular, a massa tumoral é restrita a aproximadamente 0,2 mm de distância de difusão dentro do tecido (SANG-OH et al., 2003). Este processo é governado por uma rede de sinalização integrada dependente de fatores angiogênicos solúveis, citocinas e componentes da matriz extracelular insolúvel que cercam os vasos participantes (CHO & CHOI, 2002).

O 4-NC foi citotóxico para as células endoteliais T.END.1 com IC_{50} de 15 μM (Figura 39 B) em meio de cultura D-10 (D-MEM + 10% FBS) avaliado por ensaio de exclusão do azul de tripan por 24h. Na análise de interferência na formação de tubos com as células T.END.1, o 4-NC demonstrou um importante efeito inibitório na formação de vasos em concentrações consideradas subtóxicas como 7,5 μM (Figura 39 A). Sabendo da importância do FBS na formação de tubos, sendo utilizado como controle positivo neste experimento, os tratamentos foram realizados na ausência de soro. Pensando que as linhagens de melanoma se demonstraram sensíveis ao 4-NC na ausência de FBS, foi realizado um novo experimento de citotoxicidade com estas células endoteliais em meio D-MEM sem soro (Figura 39 C). O 4-NC apresentou citotoxicidade em concentrações muito baixas (IC_{50} de 1,6 μM) para as células T.END.1, justificando a ausência de formação de tubos.

Figura 39. Efeito inibitório do tratamento e avaliação da citotoxicidade em células endoteliais t.END.1



Fonte: Autoria própria. A) Formação de tubos com células t.END.1 em matrigel após tratamento com 4-NC; B) Citotoxicidade em células t.END.1 tratadas com 4-NC (24 h) em meio D-10 (DMEM + 10% FBS); C) Citotoxicidade em células t.END.1 tratadas com 4-NC (24 h) em meio D-MEM sem FBS).

5.1.3.3 Avaliação do potencial do tratamento combinado na migração celular (Ensaio de "ferida")

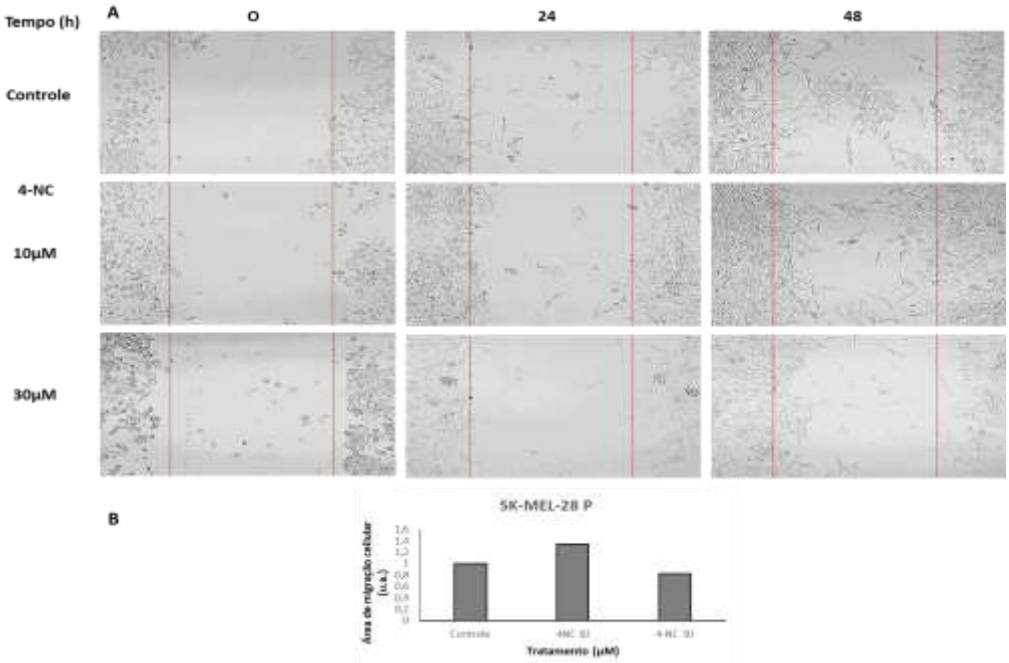
A avaliação da migração celular das linhagens tratadas com 4-NC foi realizada o ensaio de "ferida", inicialmente em duplicata com as linhagens SK-MEL-28 P e R. As linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-29, tanto parentais como resistentes, são linhagens que crescem em ilhas, dificultando assim, o alcance da alta confluência necessária na placa para a realização da ferida e posteriormente, o fechamento da ferida, o que nos impediu a realização do ensaio com estas linhagens.

Os experimentos foram realizados com exposição de até 48h. Embora estas linhagens apresentem tempo de dobramento médio de 24 horas, inicialmente não foram utilizados compostos que minimizem a proliferação das células, como diminuição de soro (LIANG, PARK & GUAN, 2007). Isso ocorreu em virtude de serem linhagens sensíveis, principalmente as células resistentes, que já

demonstraram muita sensibilidade na privação de soro (dados não mostrados). Estes dados demonstraram um potencial de 4-NC na concentração de 30 μM na inibição da migração das linhagens SK-MEL-28 P (Figura 40 A) e mais evidente na linhagem R (Figura 41 A). O cálculo da área de migração celular das linhagens tratadas com 4-NC ou tratamento combinado foi realizado em função da área de migração dos controles tratados com D10 + DMSO (0,3%) considerada como 1 (Figuras 40 e 41 B). Os dados indicam redução na migração de aproximadamente 0,8 x para a linhagem SK-MEL-28 P e de 0,6x para a SK-MEL-28 R.

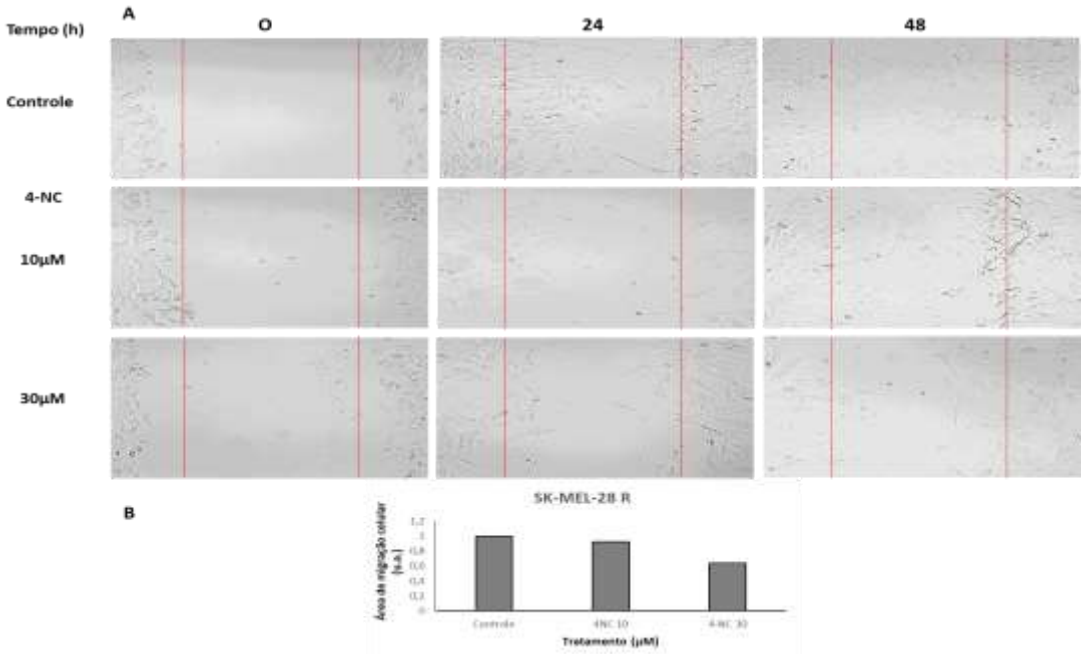
Posteriormente foram realizados os experimentos com diminuição de SFB (1%) para impedir uma possível proliferação celular no período do ensaio. Tanto a linhagem SK-MEL-28 P (Figura 42) quanto R (Figura 43) demonstraram enorme sensibilidade com a diminuição de soro, sendo confirmada por morte celular apresentada nos controles tratados com DMSO (0,1%) tratados por 48h. Embora esta sensibilidade tenha demonstrado o 4-NC como citotóxico neste período, mesmo em concentrações sub-tóxicas (5 e 10 μM), é possível observar diminuição de migração das células P e R quando tratadas com 5 μM por 24 horas quando comparadas aos controles. De qualquer forma, a citotoxicidade do 4-NC não nos permitiu avaliar corretamente a eficácia do 4-NC no processo de migração.

Figura 40. Potencial de inibição na migração celular da linhagem SK-MEL-28 P tratada com 4-NC



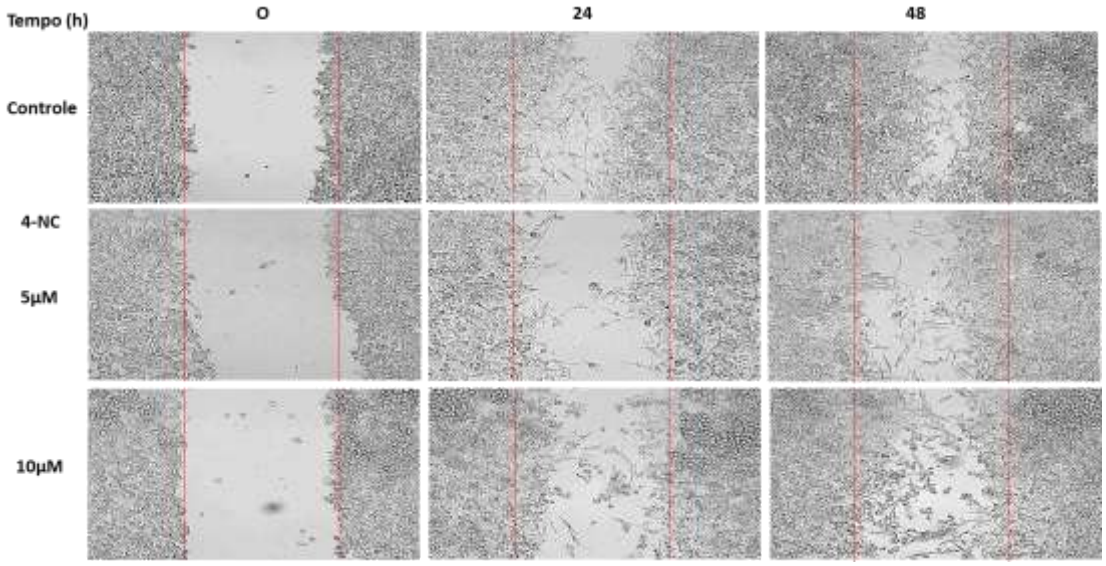
Fonte: Autoria própria. Os tratamentos utilizados foram D10 contendo DMSO (0,3%) ou 4-NC (10 e 30 µM). Fotos retiradas nos tempos de 0, 24 e 48 horas (A). Cálculo da área de migração celular nos tratamentos foram realizados em função da área do controle (unidade arbitrária - u.a.) (B).

Figura 41. Potencial de inibição na migração celular da linhagem SK-MEL-28 R tratada com 4-NC + vemurafenibe



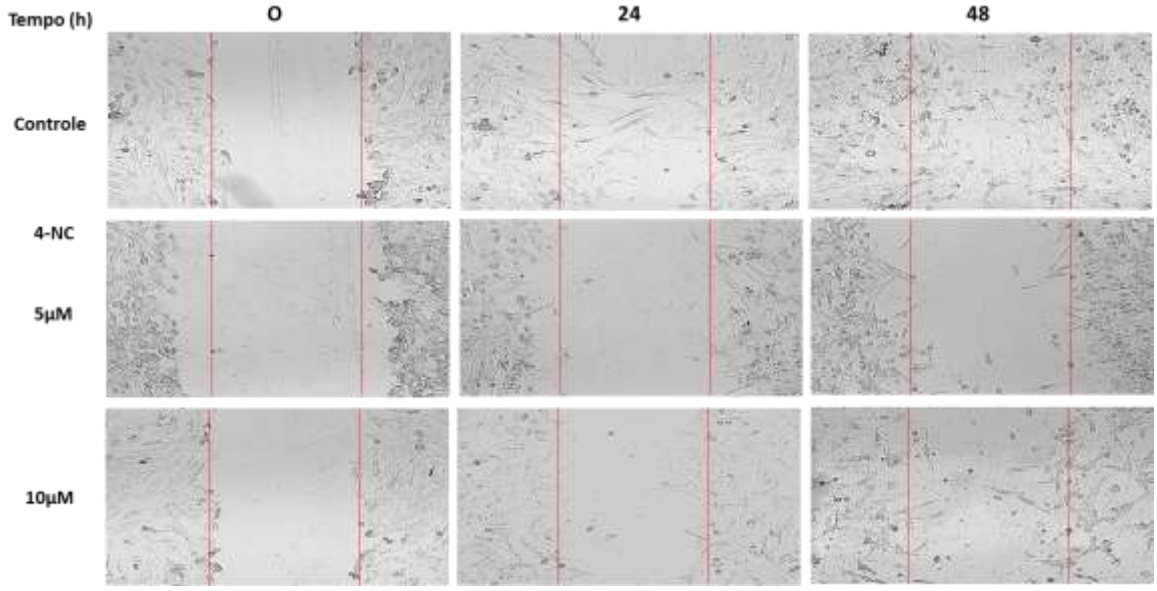
Fonte: Autoria própria. Os tratamentos utilizados foram D10 contendo DMSO (0,3%) + vemurafenibe (6 µM) ou 4-NC (10 e 30 µM) + vemurafenibe (6 µM). Fotos retiradas nos tempos de 0, 24 e 48 horas (A). Cálculo da área de migração celular nos tratamentos foram realizados em função da área do controle (unidade arbitrária - u.a.) (B).

Figura 42. Potencial de inibição na migração celular da linhagem SK-MEL-28 P tratada com menores concentrações de 4-NC e diminuição de SFB



Fonte: Autoria própria. Os tratamentos utilizados foram DMEM + SFB 1% contendo DMSO (0,1%) ou 4-NC (5 e 10 µM). Fotos retiradas nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

Figura 43. Potencial de inibição na migração celular da linhagem SK-MEL-28 R tratada com menores concentrações de 4-NC (+ vemurafenibe) e diminuição de SFB



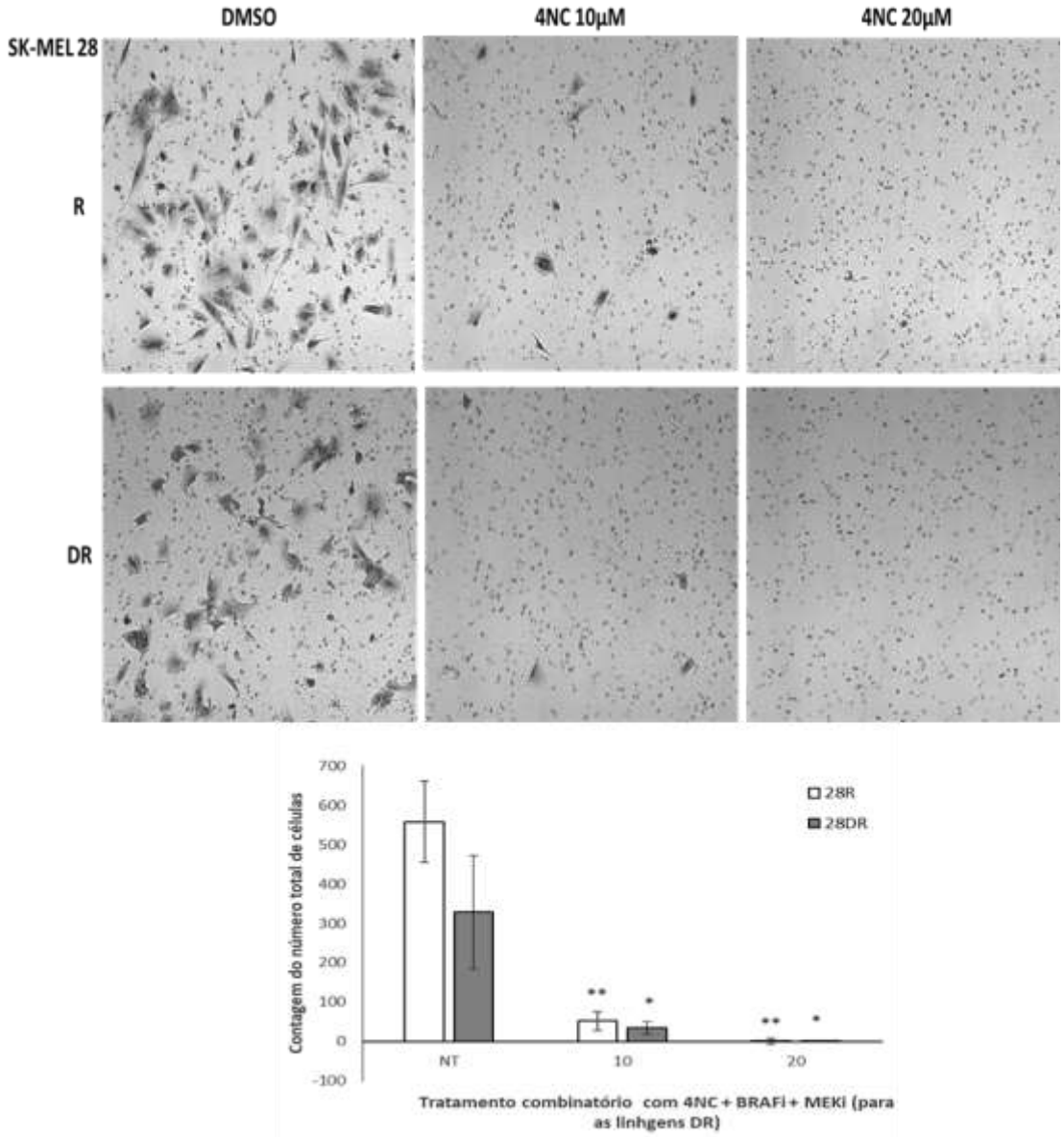
Fonte: Autoria própria. Os tratamentos utilizados foram DMEM + SFB 1% contendo DMSO (0,1%) + vemurafenibe (6 µM) ou 4-NC (5 e 10 µM) + vemurafenibe (6 µM). Fotos retiradas nos tempos de 0, 24 e 48 horas.

5.1.3.4 Avaliação do potencial do tratamento combinado na invasão celular em modelos 2D ("Câmara de Boyden - Transwell")

A linhagem SK-MEL-28 R demonstrou invasão celular muito aumentada (~14x) quando comparada com sua linhagem parental. Além disso, o tratamento com 25 μM de ilomastat (GM6001), que é um inibidor de metaloproteinases reduz aproximadamente 30% da invasão destas células (SANDRI et al., 2016). Para avaliar o potencial da combinação com 4-NC em processos de invasão, os ensaios (Câmara de Boyden – Transwell) foram realizados com as linhagens SK-MEL-28 R e DR tratadas por 24h.

O tratamento combinado com 4-NC demonstrou uma excelente eficácia na redução no número de células na superfície inferior do transwell, indicando uma diminuição significante na invasão das linhagens SK-MEL-28 R e DR (Figura 46). Brohem et al., (2009) já havia observado este potencial na diminuição da invasão das linhagens de melanoma parentais (SK-MEL-28, SK-MEL 103 e SK-MEL-147), porém, em menores proporções e consideradas significantes ($p<0,05$) apenas para as linhagens com mutação em N-RAS (SK-MEL 103 e SK-MEL-147) nas concentrações de 20 e 30 μM. Talvez, a elevada taxa de invasão celular desta linhagem tenha possibilitado a melhor visualização dos resultados. No ensaio de citotoxicidade de exclusão do azul de tripan, a porcentagem de viabilidade observada para as linhagens SK-MEL 28 R e DR na concentração de 10 μM foram de 97 e 83% respectivamente. A concentração de 20 μM não foi analisada no ensaio de citotoxicidade, mas representa aproximadamente o valor de IC_{25} para estas linhagens, desta forma, excluindo que a diminuição de invasão foi por morte celular.

Figura 44. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na invasão das linhagens SK-MEL-28 R e DR



Fonte: Autoria própria. As células foram plaqueadas em câmara de Boyden cobertas com matrigel. Após 24 horas de tratamento com a combinação dos tratamentos [Vemurafenibe (6 µM) + 4-NC (10 e 20 µM)] o número de células presentes na superfície inferior da câmara foram quantificados. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de 3 experimento em triplicata. *p<0,05 e ** p<0,01 comparado ao controle.

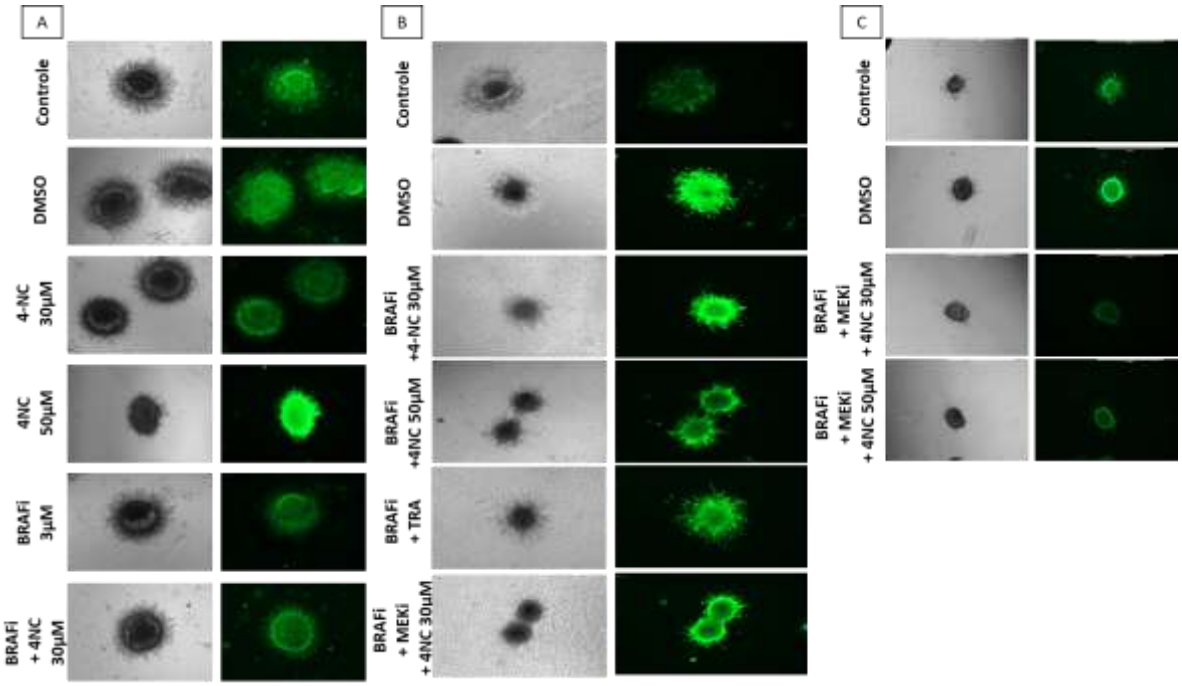
5.1.3.5 Avaliação do potencial do tratamento combinado na invasão celular em modelos 3D (Esferóides)

Estes experimentos foram realizados como parte do meu doutorado sanduíche no Wistar Institute (Filadélfia – Pensilvânia – EUA) no laboratório de microambiente tumoral (Programa de Imunologia, Microambiente e Metástase – Centro de Pesquisa do Melanoma). As linhagens SK-MEL-28 P, R e DR foram gentilmente doadas pelo Dr. Keiran S.M. Smalley (Moffitt Cancer Center and

Research Institute, Tampa, Florida) para realização dos ensaios no laboratório da Dra Ashani T. Weeraratna.

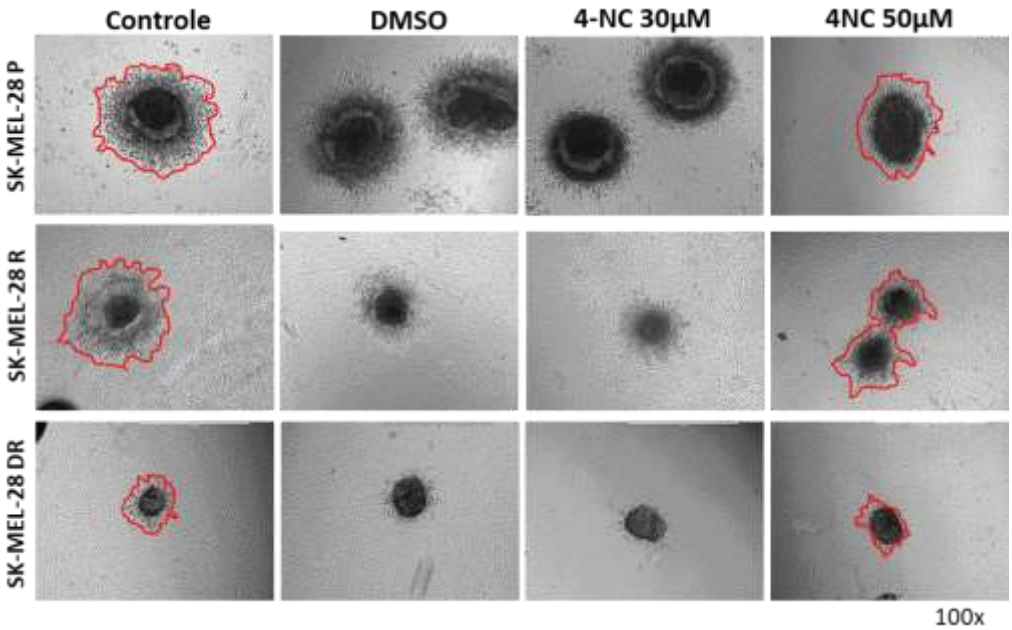
Os esferóides de melanoma tridimensionais foram realizados com células SK-MEL-28 parentais (Figura 45 A), resistentes (Figura 45 B) e duplo-resistentes aos inibidores BRAFi / MEKi (Figura 45 C), tratados por 24 h com as concentrações de 30 e 50 µM 4-NC. A 4-NC demonstrou potencial de inibição de invasão quando tratada com 50 µM demonstrada pelo contorno vermelho na figura 48. Portanto, o fato de 4-NC parecer demonstrar uma diminuição na invasividade de linhagens celulares de melanoma SK-MEL-28 parentais e resistentes aos inibidores de BRAFi / MEKi em modelos 3D está de acordo com nossos resultados anteriores demonstrados por Ensaio de Câmara de Boyden (Transwell) 2D nesta mesma linhagem celular. É importante ressaltar que os esferóides tratados pela primeira vez com BRAFi (Vemurafenibe 3 µM) ou com MEKi (Trametinib 50 nM) apresentaram invasão muito próxima ao observado nos seus respectivos controles.

Figura 45. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na invasão das linhagens SK-MEL-28 P, R e DR



Fonte: Autoria própria. Ensaio de Esferoides de melanoma tridimensionais realizado com as linhagens SK-MEL-28 parental (A), resistente (R) e duplo-resistente (DR) tratadas com 4-NC em uso isolado ou em tratamento combinatório (30 e 50 µM) com inibidores de BRAF (BRAFi - Vemurafenibe – 6 µM) e de MEK (MEKi - Trametinibe – 50 nM), exceto para os controles não tratados (Controle) e tratados com DMSO (DMSO). A linhagem SK-MEL-28 P foi tratada também com BRAFi (3 µM) e 4-NC (30 µM) e a SK-MEL-28 R com BRAFi (6 µM) e MEKi (50 nM). Fotomicrografias obtidas com microscópio de contraste de fase e fluorescência detectada por calceína – AM. Aumento de 100x.

Figura 46. Demonstração de diminuição da invasão no tratamento com 4-NC na invasão das linhagens SK-MEL-28 P, R e DR



Fonte: Autoria própria. As células parentais foram tratadas com DMSO, 4-NC (30 ou 50 µM) ou não tratadas (Controle). As células resistentes também foram tratadas com BRAFi - 6 µM (SK-MEL-28 R) ou BRAFi/MEKi - 50 nM (SK-MEL-28 DR). O contorno vermelho evidencia o alo formado pela invasão das células. Aumento de 100x.

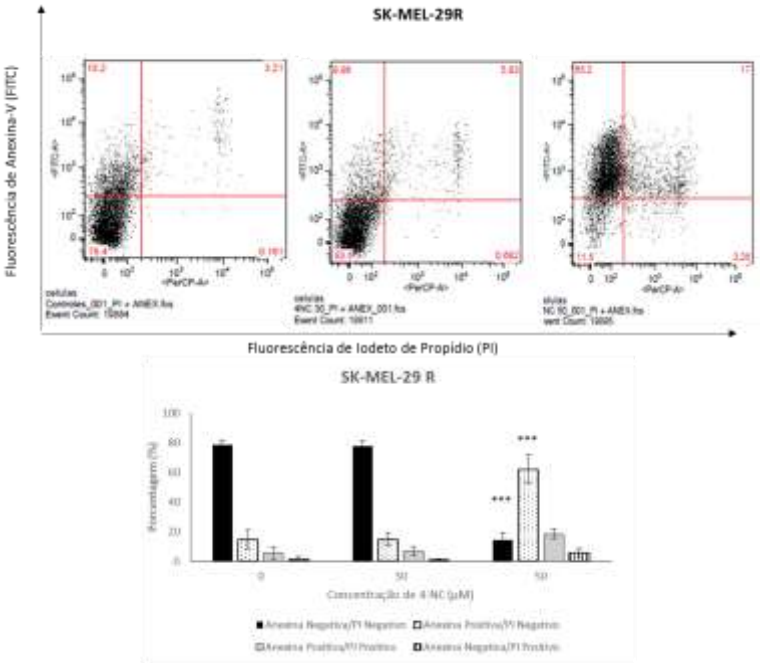
5.1.3.6 Investigação de morte celular induzida pelos tratamentos combinados por Citometria de Fluxo

Para uma real diferenciação entre necrose e apoptose, experimentos foram realizados com a avaliação da externalização da FS (fosfatidilserina) na membrana de células apoptóticas e da internalização de PI em células necróticas. Em virtude de linhagens parentais terem sido foco do trabalho de Brohem et. al. (2009; 2012) esta análise foi realizada com linhagens resistentes. Foram utilizados tratamentos combinados de 24h para as linhagens resistentes (Vemurafenibe + 4-NC 50 µM) e duplo-resistentes (vemurafenibe +trametinibe + 4-NC 50 µM). Controles negativos com DMSO 0,5% e positivos com DMSO 10% para as devidas compensações foram utilizados. Foram realizados 3 experimentos em triplicata.

Na avaliação do potencial de indução de morte celular com os tratamentos combinados, a concentração de 30 µM de 4-NC não demonstrou diferenças significantes do controle para nenhuma das linhagens testadas. A concentração de 50 µM de 4-NC foi capaz de induzir apoptose significantemente ($p < 0,001$) em aproximadamente 62% das células de melanoma SK-MEL-29 R, 38,6% da SK-MEL-

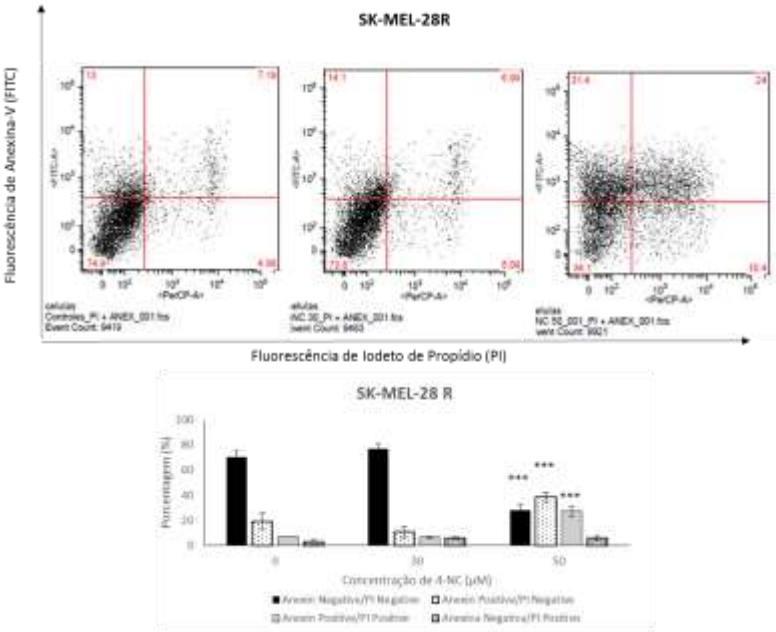
28 R e 53,2% da SK-MEL-28 DR quando comparado aos controles, evidenciado pelo aumento na intensidade de fluorescência com anexina V-FITC (Figuras. 47, 48 e 49 respectivamente). Uma porção significante (p< 0,001) de apoptose tardia (27,4%) também foi observada para a linhagem SK-MEL-28 R. A linhagem duplo-resistente apresentou apenas 60% de viabilidade nos controles tratados com 0,5% de DMSO provavelmente devido à alta sensibilidade desta linhagem, que foi comprovada com as repetições do ensaio. Na análise da linhagem SK-MEL-19 R uma resposta diferente foi observada (Figura 50), demonstrando que o 4-NC também pode induzir preferencialmente necrose (26,1%) nas células resistentes (p< 0,05) ao invés de apoptose (15,7%) e apoptose tardia (17,9%) como ocorreram com as outras linhagens.

Figura 47. Indução de apoptose na linhagem SK-MEL-29 R com 4-NC em tratamento combinado



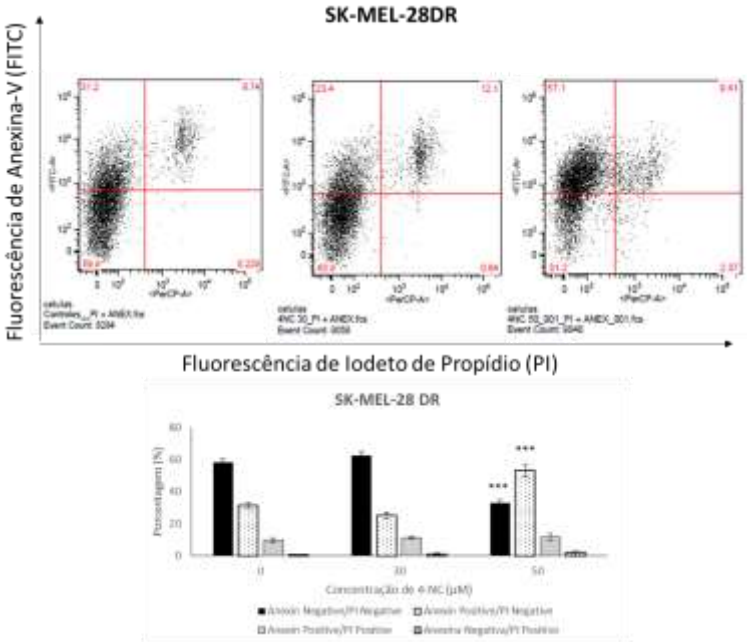
Fonte: Autoria própria. Tratamento combinado [vemurafenibe 6 µM + 4-NC (0, 30 e 50 µM)] analisado por citometria de fluxo. A. *Dot plots* demonstrando a intensidade de fluorescência de Anexina-FITC no eixo X em função da intensidade de fluorescência de PI no eixo y. B. Porcentagem de células vivas (Anexina negativa/PI negativo), de células apoptóticas (Anexina positiva/PI negativo), de células em apoptose tardia (Anexina positiva/PI positivo) e de células necróticas (Anexina positiva/PI positivo) após análise por citometria de fluxo. *** p<0,001 na comparação com os controles.

Figura 48. Indução de apoptose na linhagem SK-MEL-28 R com 4-NC em tratamento combinado



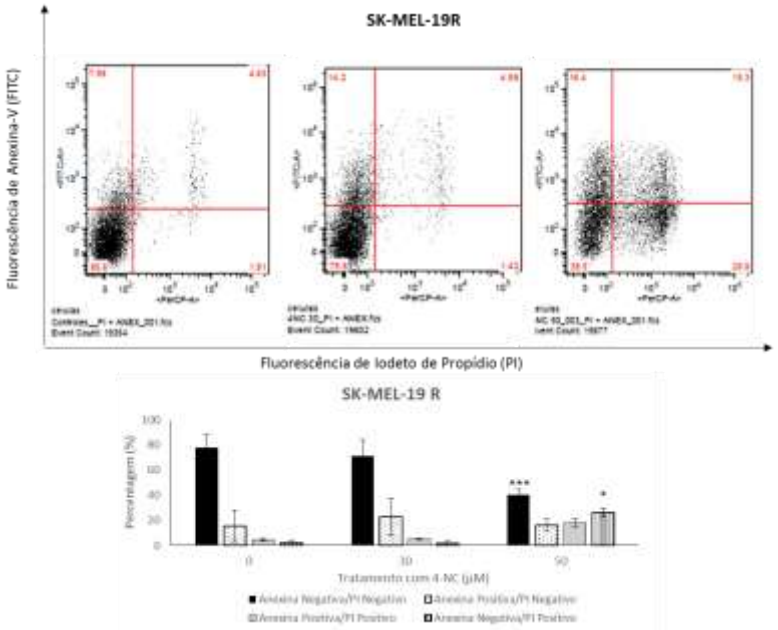
Fonte: Autoria própria. Tratamento combinado [vemurafenibe 6 µM + 4-NC (0, 30 e 50 µM)] analisado por citometria de fluxo. A. *Dot plots* demonstrando a intensidade de fluorescência de Anexina-FITC no eixo X em função da intensidade de fluorescência de PI no eixo y. B. Porcentagem de células vivas (Anexina negativa/PI negativo), de células apoptóticas (Anexina positiva/PI negativo), de células em apoptose tardia (Anexina positiva/PI positivo) e de células necróticas (Anexina positiva/PI positivo) após análise por citometria de fluxo. ***p<0,001 na comparação com os controles.

Figura 49. Indução de apoptose na linhagem SK-MEL-28 DR com 4-NC em tratamento combinado



Fonte: Autoria própria. Tratamento combinado [vemurafenibe 6 µM + trametinibe 100 nM + 4-NC (0, 30 e 50 µM)] analisado por citometria de fluxo. A. *Dot plots* demonstrando a intensidade de fluorescência de Anexina-FITC no eixo X em função da intensidade de fluorescência de PI no eixo y. B. Porcentagem de células vivas (Anexina negativa/PI negativo), de células apoptóticas (Anexina positiva/PI negativo), de células em apoptose tardia (Anexina positiva/PI positivo) e de células necróticas (Anexina positiva/PI positivo) após análise por citometria de fluxo. ***p<0,001 na comparação com os controles.

Figura 50. Indução de necrose na linhagem SK-MEL-19 R com 4-NC em tratamento combinado



Fonte: Autoria própria. Tratamento combinado [vemurafenibe 3 µM + 4-NC (0, 30 e 50 µM)] analisado por citometria de fluxo. A. *Dot plots* demonstrando a intensidade de fluorescência de Anexina-FITC no eixo X em função da intensidade de fluorescência de PI no eixo y. B. Porcentagem de células vivas (Anexina negativa/PI negativo), de células apoptóticas (Anexina positiva/PI negativo), de células em apoptose tardia (Anexina positiva/PI positivo) e de células necróticas (Anexina positiva/PI positivo) após análise por citometria de fluxo. ***p<0,001 e *p< 0,05 na comparação com os controles.

5.1.3.7 Investigação do mecanismo de ação dos tratamentos combinados através de deteçcão de níveis protéicos por Western blotting

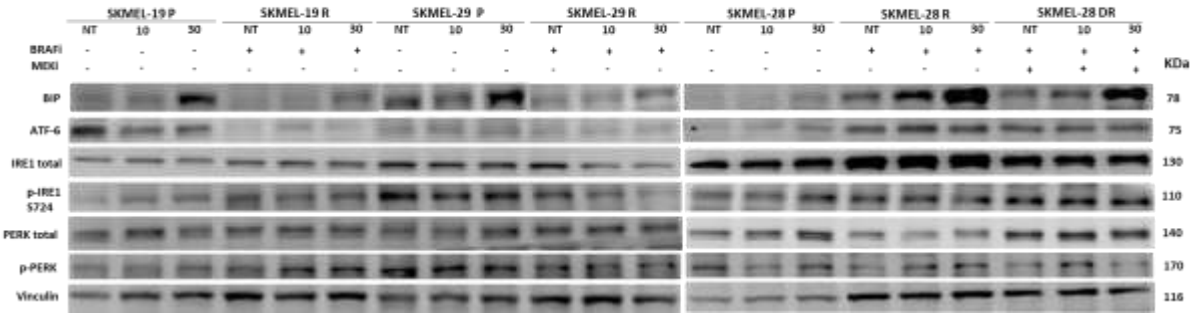
Alguns quimioterápicos, principalmente os inibidores proteassomais induzem morte celular por apoptose mediada por estresse do retículo endoplasmático (RE) (BAKHSHI et al, 2008; DREXLER, 2009; NAWROCKI et al., 2005; MARIA et al., 2013), desta forma, decidimos investigar se o 4-NC, um inibidor proteassomal 20S, também pode induzir estresse do RE.

Analisando a expressão das principais proteínas envolvidas com o estresse do RE em todas as linhagens utilizadas no estudo, a linhagem SK-MEL-19 P demonstrou aumento de p-IRE1 e p-PERK enquanto a SK-MEL-19 R apresentou aumento de p-PERK também. As linhagens SK-MEL-29 demonstraram expressão proteica levemente aumentada de PERK total (P) e p-IRE1 (R). Para as linhagens SK-MEL-28 várias proteínas foram alteradas, sendo a linhagem parental com aumento de ATF-6, IRE1 total e PERK total, a linhagem resistente com IRE1 total, PERK total e fosforilado (p-PERK) e a linhagem duplo-resistente aumento de p-

PERK com 10 µM de 4-NC e diminuição em 30 µM. Esta linhagem demonstrou ainda diminuição de IRE1 total. Embora por vias diferentes, o aumento na expressão de BiP/GRP78 demonstra a ativação da resposta UPR em todas as linhagens, porém esta expressão foi mais exacerbada nas linhagens derivadas da SK-MEL-28 P, R e DR (Figura 51). Estas linhagens foram escolhidas para uma investigação mais cuidadosa destas vias de indução da UPR.

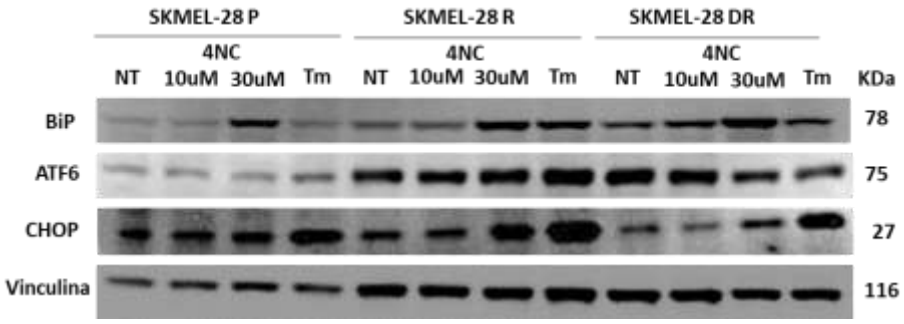
Analisando a expressão de ATF-6 para as linhagens derivadas da SK-MEL-28, somente um leve aumento para a linhagem R foi observado (Figura 52). Para a via de sinalização iniciada por PERK, o tratamento com 4-NC demonstrou aumento de t-IRE1, PDI, Ero-1 e HERPUD1 para as linhagens P e R, exceto Ero-1 que foi induzido apenas na linhagem P. Diferentemente, a linhagem DR demonstrou indução proteica de p-IRE1 e diminuição de t-IRE1 (Figura 53). É descrito que com persistente estresse do RE, a atividade de ATF6 e p-IRE1 podem ser atenuadas enquanto de PERK é mantida (HERSEY & ZANG, 2008). Já a análise da via de PERK demonstra ativação de vias semelhantes entre as linhagens parentais e resistentes, apresentando superexpressão de PERK total, p-ATF4 e ATF3 após os tratamentos com 4-NC. A linhagem DR demonstrou ativação de p-PERK e GADD34, que por sua vez controla por feedback negativo a foaforilação de eIF2a e ATF4 (Figura 54). De qualquer forma, a superexpressão de BiP e CHOP em todas as linhagens demonstram que 4-NC é capaz de induzir estresse ER por resposta protéica desenovelada (UPR) (Figuras 54, 53 e 54). CHOP tem o papel de induzir apoptose durante o estresse prolongado de ER (SZEGEZDI et al., 2006).

Figura 51. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na expressão das principais proteínas da resposta UPR



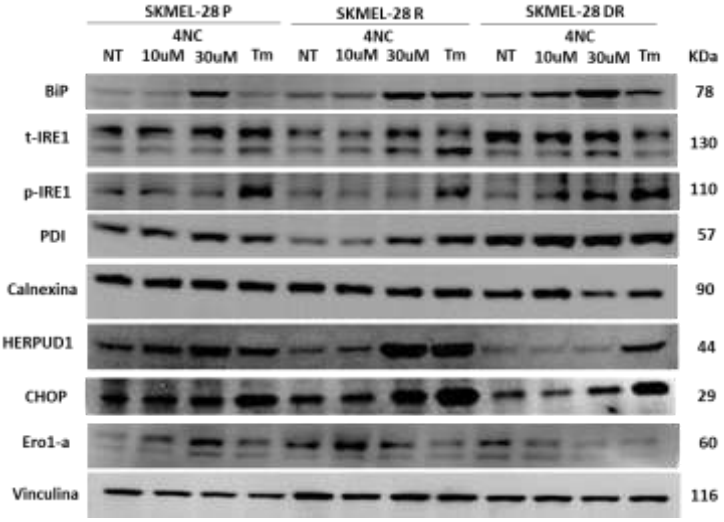
Fonte: Autoria própria. As linhagens SK-MEL-19 Parental (P), SK-MEL-19 resistente (R), SK-MEL-29 parental (P), SK-MEL-29 resistente (R), SK-MEL-28 parental (P), SK-MEL-28 resistentes (R) e SK-MEL-28 duplo-resistente DR foram tratadas por 24 h com a combinação [Vemurafenibe (3 ou 6 μM) + 4-NC (10 e 30 μM)]. O trametinibe (50 nM) foi utilizado no tratamento da linhagem DR. ATF-6 (*activating transcription factor-6*); IRE1 (*phospho-inositol requiring enzyme 1*) total e phospho (p-IRE1); PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*) total e phospho (p-PERK). Vinculina foi utilizada como controle endógeno.

Figura 52. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na expressão de ATF-6



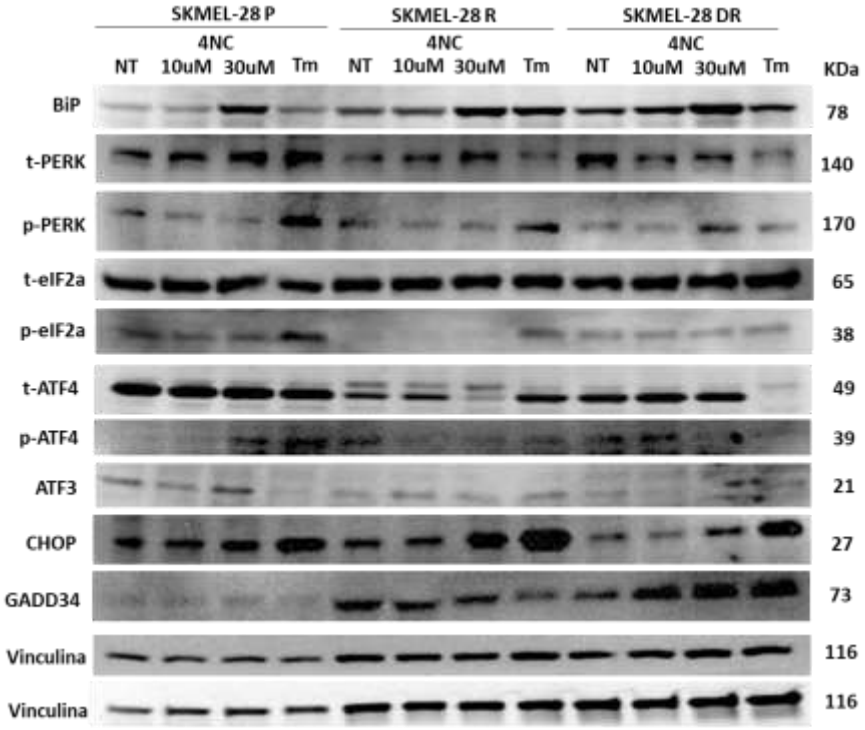
Fonte: Autoria própria. As linhagens SK-MEL-28 parental (P), SK-MEL-28 resistentes (R) e SK-MEL-28 duplo-resistente DR foram tratadas por 24 h com a combinação [Vemurafenibe (6 μM) + 4-NC (10 e 30 μM)]. O trametinibe (50 nM) foi utilizado no tratamento da linhagem DR. A Tunicamicina (2μg/mL – 8h) foi utilizado como controle positivo. BiP (*Binding immunoglobulin protein*); ATF-6 (*activating transcription factor-6*); CHOP (*CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*). Vinculina foi utilizada como controle endógeno.

Figura 53. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na expressão da via de IRE1



Fonte: Autoria própria. As linhagens SK-MEL-28 parental (P), SK-MEL-28 resistentes (R) e SK-MEL-28 duplo-resistente DR foram tratadas por 24 h com a combinação [Vemurafenibe (6 µM) + 4-NC (10 e 30 µM)]. O trametinibe (50 nM) foi utilizado no tratamento da linhagem DR. A Tunicamicina (2µg/mL – 8h) foi utilizada como controle positivo. BiP (*Binding immunoglobulin protein*); IRE1 (*phospho-inositol requiring enzyme 1*) total e phospho (p-IRE1); PDI (*Protein disulfide isomerase*); HERPUD1 (*Homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 1 protein*); CHOP (*CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*); Ero1-a (*ER oxidoreductin 1*). Vinculina foram utilizadas como controle endógeno.

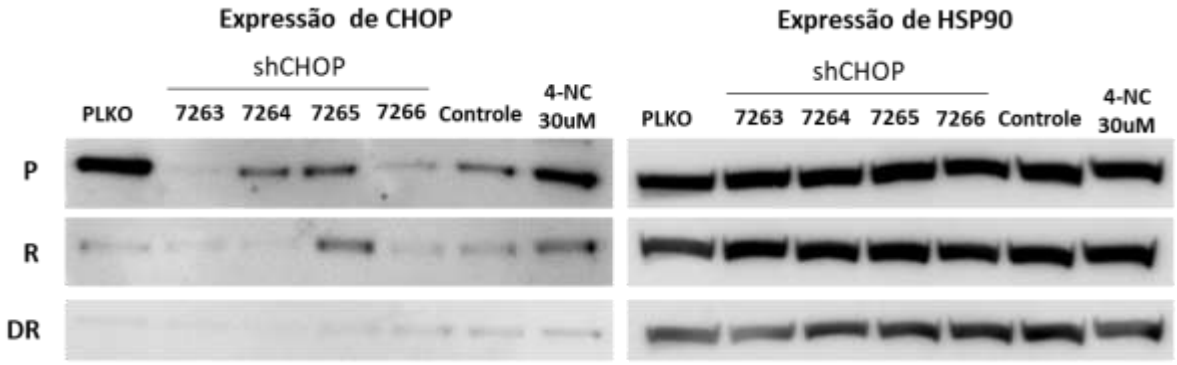
Figura 54. Efeito do tratamento combinado com 4-NC na expressão da via de PERK



Fonte: Autoria própria. As linhagens SK-MEL-28 parental (P), SK-MEL-28 resistentes (R) e SK-MEL-28 duplo-resistente DR foram tratadas por 24 h com a combinação [Vemurafenibe (6 µM) + 4-NC (10 e 30 µM)]. O trametinibe (50 nM) foi utilizado no tratamento da linhagem DR. A Tunicamicina (2µg/mL – 8h) foi utilizado como controle positivo. BiP (*Binding immunoglobulin protein*); PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*) total e phospho (p-PERK); eIF2a (*eukaryotic initiation factor α2*); ATF-4 (*Activating transcription factor 4*); ATF-3 (*Cyclic AMP-dependent transcription fator*); CHOP (*CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein*); GADD34 (*phosphatase growth arrest and DNA damage inducible gene 34*). Vinculina foram utilizadas como controle endógeno.

Para avaliar se a apoptose demonstrada anteriormente em células resistentes e duplo-resistentes é dependente de CHOP, foi realizado o silenciamento de CHOP humano (shRNA) em todas as linhagens celulares do estudo, que por sua vez, foi confirmado por Western blotting (Figura 55). Como controles, a linhagem celular SK-MEL-28 que não passou pelo processo de infecção foi utilizada para comparação com as linhagens silenciadas na ausência (controle negativo) e presença de tratamento com 30 µM 4-NC (controle positivo). Estes experimentos também fizeram parte de meu doutorado sanduíche no Wistar Institute. As células de melanoma resistentes e duplo-resistentes apresentaram menor expressão basal dessa proteína. Foram escolhidos dois clones para cada linhagem que apresentaram menor expressão de CHOP, sendo 7263 e 7266 para células parentais e 7263 e 7264 para células resistentes e duplo-resistentes juntamente com vetor vazio de PLKO para todas as linhagens celulares.

Figura 55. Silenciamento de CHOP (shCHOP) nas linhagens SK-MEL-28 P, R e DR

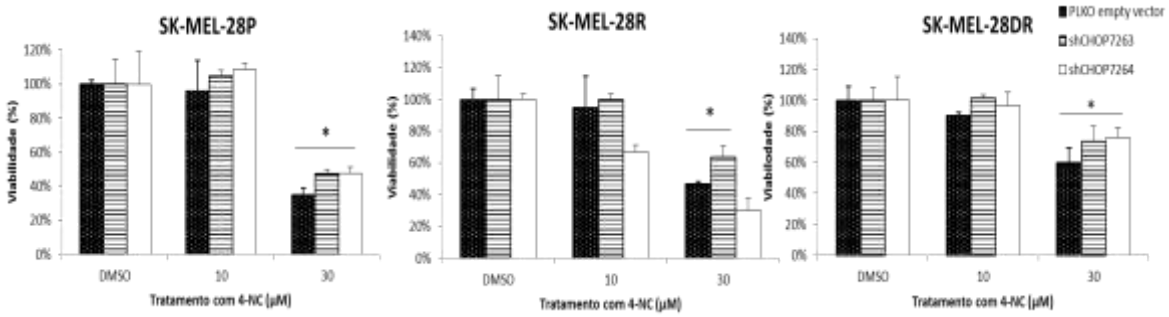


Fonte: Autoria própria. Western blotting realizado com as células utilizadas na infecção com os plasmídeos de interesse para silenciar CHOP (shCHOP) humano e o vetor vazio (PLKO). As linhagens SK-MEL-28 parental (P), resistente (R) e duplo-resistente (DR) sem shRNA foram utilizadas como controles na ausência (controle negativo) e presença de tratamento com 30 µM de 4-NC (controle positivo). HSP90 foi usado como controle endógeno.

Após a obtenção das células silenciadas, o ensaio de exclusão do azul de Tripan foi realizado em 2 experimentos independentes em duplicata para investigar se o silenciamento de CHOP pode contribuir para a apoptose induzida por tratamento com 4-NC por 24 h (Figura 56). Nossos resultados demonstram diminuição na morte celular das linhagens celulares silenciadas para CHOP quando tratadas com 4-NC e comparadas aos controles com o vetor vazio (PLKO), embora

uma das linhagens resistentes silenciadas para CHOP tenha apresentado menor viabilidade.

Figura 56. Porcentagem de apoptose em linhagens SK-MEL-28 P, R e DR CHOP silenciadas após tratamento com 4-NC



Fonte: Autoria própria. O 4-NC foi utilizado em uso isolado ou em tratamento combinatório com BRAFi e MEKi. Os dados foram apresentados como viabilidade (%) comparando o vetor vazio PLKO e shCHOP (7263 e 7266 para as linhagens parentais (P); 7263 e 7264 para células resistentes (R) e duplamente resistentes (DR). *p< 0,05 na comparação com os controles.

5.2 Ensaios *in vivo*

5.2.1 Ensaio Toxicológico – Agudo – 5 e 10mg/kg (I.P.)

Inicialmente, a avaliação da toxicidade por *via intraperitoneal* (200uL) do composto 4-NC diluído em DMSO:H_2O (1:5) foi realizada com as doses de 5 e 10 mg de 4-NC por kg de peso corpóreo utilizando 2 animais por grupo e por dose.

Não houve alteração no peso dos animais controles e tratados com 4-NC após 24 horas de observação, tanto para a dose de 5mg/kg quanto para a de 10 mg/kg (Tabela 6). Os animais tratados com 4-NC diluído em DMSO apresentaram os olhos um pouco fechados após 30 minutos da administração, mas já demonstravam comportamento normal após 4 horas. Os animais ainda permaneceram em observação por mais 15 dias após a administração e não foram observadas alterações.

No momento da eutanásia não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos selecionados (pulmão, fígado, rins e cérebro) e comportamentais que pudessem inviabilizar o ensaio tumorigênico (Tabela 7). Os animais tratados com 5 e 10 mg de 4-NC apresentaram tendência de aumento do peso absoluto do fígado, porém esta diferença não foi significante (p= 0,0585). Em virtude de resultados

anteriores com os ensaios toxicológicos com doses repetidas de 4-NC incorporado em Hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HB-β-CD) não tenham mostrado alterações (dados não mostrados), decidimos iniciar o experimento tumorigênico com doses repetidas de 10 mg de 4-NC por kg de peso corpóreo pela *via intraperitoneal*.

Tabela 6. Peso corpóreo dos animais observados após a administração de 4-NC. Animais submetidos ao ensaio toxicológico agudo com administração de 5 e 10 mg/kg de 4-NC diluído em DMSO/H_20 por via intraperitoneal

		Peso corpóreo (g)			
Grupos/ Animal	**Data administração**	**30 min**	**04 h**	**24 h**	**Observações**
DMSO I (#39)	11/11/2014	18,4	18,0	18,2	Normal
DMSO II (#40)	11/11/2014	17,2	17,0	17,1	Normal
4-NC I (#41)*	11/11/2014	20,1	19,8	19,9	Apresentaram os olhos um pouco fechados com 30 min de administração
4-NC II (#42)*	11/11/2014	20,3	20,4	20,0	
4-NC III (#43)**	11/11/2014	21,0	20,0	20,2	
4-NC IV (#44)**	11/11/2014	20,1	19,6	19,8	

Fonte: Autoria própria. Controle - Animais tratados com DMSO/H_2O (1:5); *Animais tratados com 5mg/kg de 4-NC; ** animais tratados com 10 mg/kg de 4-NC

Tabela 7. Peso corpóreo e dos órgãos dos animais observados no momento da necropsia. Animais submetidos ao ensaio toxicológico agudo com administração de 5 e 10mg/kg de 4-NC por via intraperitoneal

		Peso (g)						
Grupos/ Animal	**Peso animais**	**Pulmão**	**Fígado**	**Rim direito**	**Rim esquerdo**	**Baço**	**Cérebro**	**Observações macroscópicas**
DMSO I	21,0	0,35	1,56	0,19	0,17	0,18	0,40	Normal
DMSO II	19,2	0,27	1,50	0,16	0,17	0,10	0,38	Normal
4-NC I*	21,4	0,36	1,86	0,17	0,21	0,10	0,41	Normal
4-NC II*	21,6	0,33	1,71	0,21	0,18	0,13	0,39	Normal
4-NC III**	21,4	0,36	1,72	0,18	0,19	0,13	0,40	Normal
4-NC IV**	20,2	0,36	1,75	0,17	0,20	0,17	0,40	Normal

Fonte: Autoria própria. Controle - Animais tratados com DMSO/H_2O (1:5); *Animais tratados com 5mg/kg de 4-NC; ** animais tratados com 10 mg/kg de 4-NC

5.2.2 Ensaio Tumorigênico - Tratamento intraperitoneal - 10mg/kg

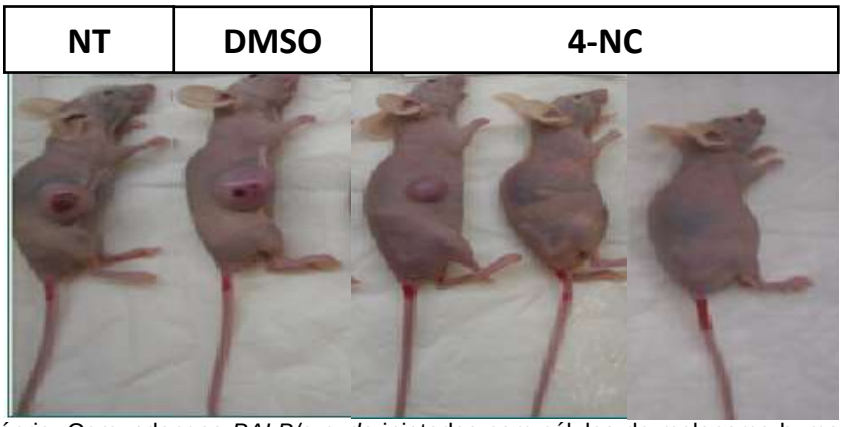
O ensaio tumorigênico (tratamento intraperitoneal) foi realizado por três experimentos independentes, ao qual no total, dezoito camundongos da linhagem BALB/c Nude de 8-12 semanas (15-20g) foram inoculados subcutaneamente (s.c.) com células de melanoma humano SK-MEL-103 ($5x10^5$ células), linhagem que apresentou os melhores resultados com o tratamento com 4-NC nos ensaios *in vitro* (BROHEM et al., 2009, 2012). Após o tempo de latência de aproximadamente 7 dias (tempo necessário para o desenvolvimento do tumor), iniciou-se o tratamento com 10 mg/kg de 4-NC (n= 10), DMSO (n= 5) ou não tratado (NT – n= 3) via i.p. (200µl) 3 vezes por semana, durante 3 semanas.

A foto representativa dos animais pertencentes aos três grupos (NT, DMSO e 4-NC) utilizados neste estudo demonstra as diferenças entre os tamanhos tumorais dos animais de cada grupo no dia da eutanásia (Figura 57). O 4-NC foi capaz de reduzir significantemente ($p<0,05$) os tumores xenográficos (4/10) em até quase 4 vezes quando comparados ao controle tratado com DMSO, e apresentou remissão tumoral completa de um animal (1/10), identificado como 4-NC V. Além disso, os animais dos grupos controles (NT e DMSO) apresentaram mais ulcerações nos tumores, o que representa um pior prognóstico clínico.

A média dos volumes tumorais após a administração de cada dose foi calculada e está representada na figura 58. Embora os valores de desvio padrão sejam elevados (Figura 58 A), estas diferenças podem ser explicadas pelas variações no volume tumoral (Figura 58 B), provavelmente devido à existência de heterogeneidade interindividual.

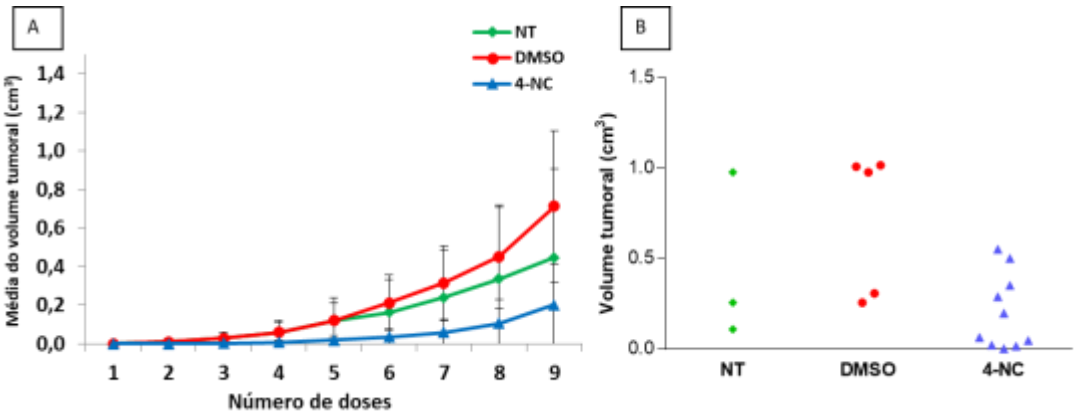
Quando analisamos o peso corpóreo dos animais, embora quatro animais do grupo 4-NC tenha apresentado uma leve diminuição do peso corpóreo (4-NC I, VII, VII e IX), a comparação das médias obtidas entre os grupos não demonstrou diferenças significantes (Figura 59 A). O consumo de ração em cada uma das doses também não apresentou diferenças entre os grupos, mesmo apresentando variações entre doses (Figura 59 B).

Figura 57. Potencial inibitório em modelos xenográficos tratados com 4-NC



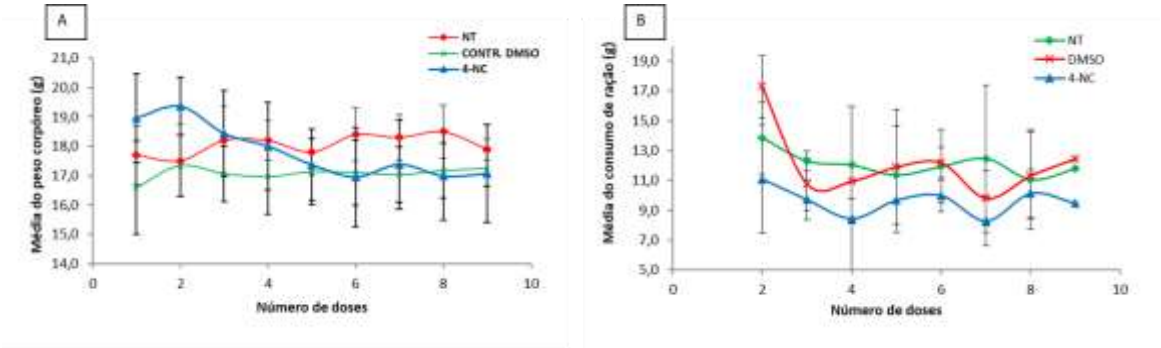
Fonte: Autoria própria. Camundongos *BALB/c nude* injetados com células de melanoma humano, SK-MEL-103: animal não tratado (NTI), animal tratado com DMSO i.p. (C. DMSO I) e animais tratados com 10 mg/kg de peso corpóreo de 4-NC (4-NC I, II e V), demonstrando as diferenças no volume tumoral entre os grupos.

Figura 58. Volumes tumorais dos animais tratados com 10 mg/kg de 4-NC i.p. por 3 semanas



Fonte: Autoria própria. Média de volume tumoral (cm^3) entre os diferentes grupos experimentais durante os tratamentos estão apresentados no eixo x e o número de doses administradas (9 doses) no eixo y (A) e volume tumoral de cada animal no dia da eutanásia está apresentado no eixo x em função dos grupos não tratado (NT), tratados com DMSO (DMSO) ou 4-NC no eixo y (B). Número de animais NT (n=3), DMSO (n=5) e tratados com 4-NC (n=10).

Figura 59. Peso corpóreo dos animais e consumo de ração de cada grupo medido nos dias de tratamento intraperitoneal (9 doses) com 10mg/Kg de 4-NC

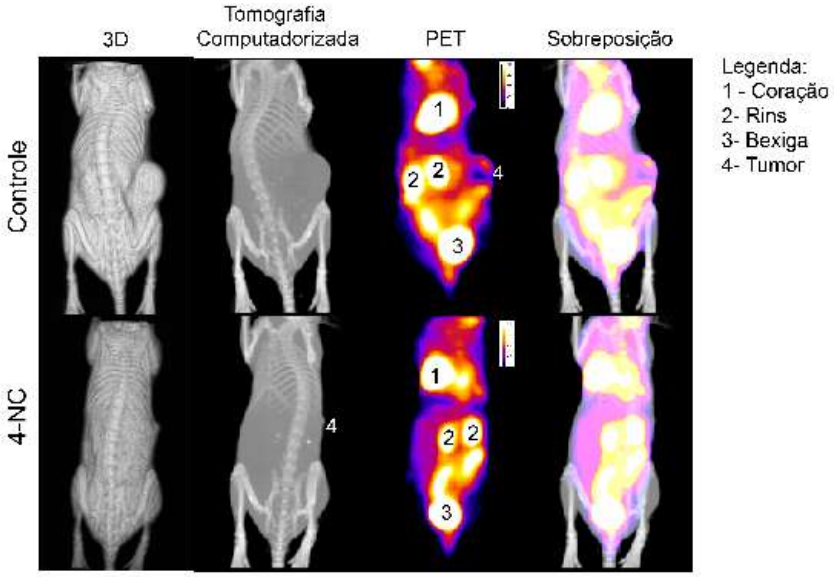


Fonte: Autoria própria. A) Gráfico da média e desvio padrão do peso corpóreo (g) dos grupos dos animais utilizados no ensaio tumorigênico. B) Gráfico da média e desvio padrão do consumo de ração (g) dos animais submetidos ao experimento tumorigênico.

Antes da eutanásia, as imagens realizadas com o equipamento Micro PET-CT demontraram as diferenças tumorais entre o grupo controle tratado com DMSO e o grupo tratado com 4-NC (Figura 60).

No momento da necropsia algumas alterações macroscópicas foram observadas na morfologia do fígado dos animais tratados com 4-NC, como pode ser observado na tabela 8.

Figura 60. Diferenças tumorais entre os animais do grupo controle e tratado com 4-NC no ensaio xenográfico



Imagens do Micro PET-CT obtidas com um animal do grupo controle tratado com DMSO e um animal tratado com 4-NC revelando as diferenças tumorais entre os animais. Há marcações não específicas no coração, rins e bexiga. As imagens foram obtidas pelo técnico Walter Turato.

Na análise molecular dos tumores destes animais, os resultados do RT-PCR em tempo real demonstraram expressão diminuída de MMP2 e MMP14 quando comparado com o controle tratado com DMSO, demonstrando um possível papel do 4-NC na inibição de invasão em células de melanoma *in vivo* (Figura 61). Devido à dificuldade de extração de RNA nestas amostras de tumores só foi possível realizar a análise com 1 animal por grupo. A análise por western blotting dos tumores extraídos destes animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais (Figura 62) demonstrou aumento na expressão das proteínas p53 e PARP clivado, indicando possível indução de apoptose. A interferência de um animal controle tratado com DMSO nestes resultados de RT-PCR e western blotting foi observada,

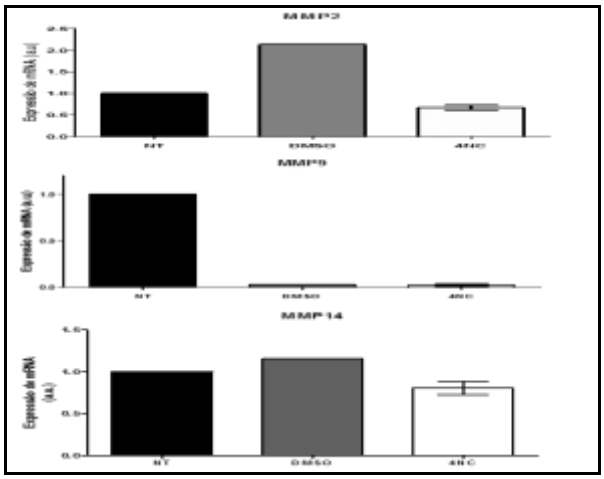
mas devido ao número pequeno de animais não foi possível investigar mais profundamente estas diferenças entre os controles.

Tabela 8. Observações macroscópicas realizadas no momento da necropsia dos animais submetidos ao experimento tumorigênico com tratamento intraperitoneal (9 doses)

Grupos /Animal	Data eutanásia	Pulmão	Fígado	Observações
NT I	19/12/2014	0	0	Tumor com ulceração
NT II	20/02/2015	0	0	Tumor com ulceração
NT III	08/04/2015	0	0	Sem ulceração
DMSO I	19/12/2014	0	0	Tumor com ulceração
DMSO II	19/12/2014	0	0	Tumor com ulceração
DMSO III	20/02/2015	0	0	Tumor com ulceração
DMSO IV	08/04/2015	0	0	Tumor com ulceração
DMSO V	08/04/2015	0	0	Tumor com ulceração
T. 4-NC I	19/12/2014	0	0	Alteração macroscópica no fígado - lóbulos levemente inchados
T. 4-NC II	19/12/2014	0	0	Alteração macroscópica no fígado - lóbulos levemente inchados
T. 4-NC III	19/12/2014	0	0	Alteração macroscópica no fígado - lóbulos levemente inchados
T. 4-NC IV	20/02/2015	0	0	Normal
T. 4-NC V	20/02/2015	0	0	Alteração macroscópica no fígado - lóbulos levemente inchados
T. 4-NC VI	20/02/2015	0	0	Normal
T. 4-NC VII	08/04/2015	0	0	Alteração macroscópica no fígado - lóbulos levemente inchados
T. 4-NC VIII	08/04/2015	0	0	Alteração macroscópica no fígado - lóbulos levemente inchados
T. 4-NC IV	08/04/2015	0	0	Alteração macroscópica no fígado - lóbulos levemente inchados
T. 4-NC V	08/04/2015	0	0	Alteração macroscópica no fígado - lóbulos levemente inchados

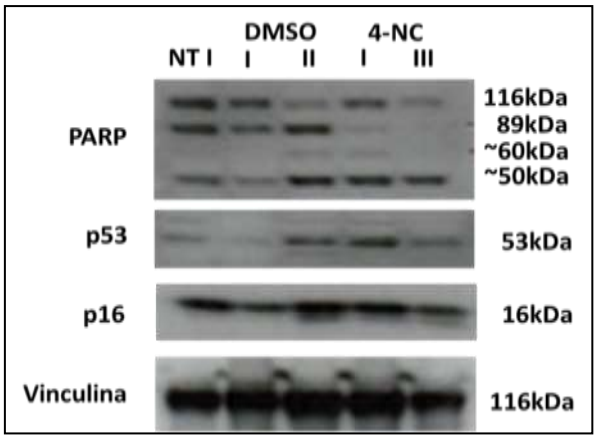
Fonte: Autoria própria. NT – animais não tratados; DMSO – animais tradados com DMSO:H_2O; 4-NC – animais tratados com 10 mg/kg de 4-NC.

Figura 61. Expressão de mRNA de MMP2, MMP9 e MMP14 observadas nos tumores dos animais dos diferentes grupos experimentais



Fonte: Autoria própria. Análise da expressão gênica das Metaloproteinases (MMP2, MMP9 2 MMP14). Os animais foram tratados com 4-NC 10 mg/kg, DMSO ou não tratados (NT). B-ACTINA e GAPDH foram utilizados na normalização. N = 1 animal por grupo, exceto para o grupo 4-NC (n= 2).

Figura 62. Expressão proteica do marcador p53 e PARP detectada nos tumores dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais



Fonte: Autoria própria. Análise da expressão proteica de PARP e p53. Os animais foram tratados com 4-NC 10 mg/kg, DMSO ou não tratados (NT). Vinculina foi utilizada como controle endógeno.

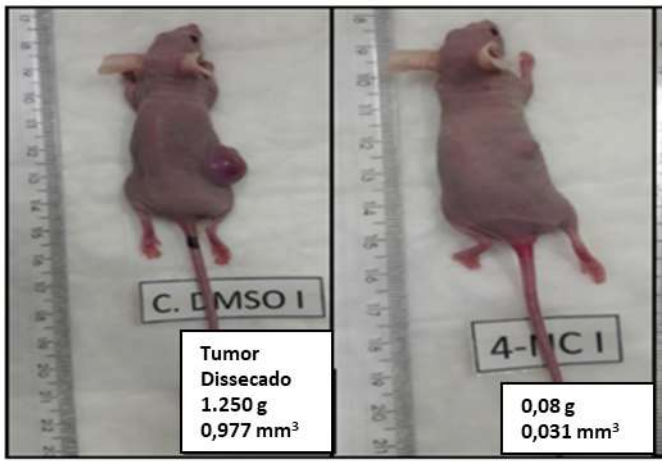
5.2.3 Ensaio Tumorigênico - Tratamento subcutâneo - 10mg/kg

Pensando em uma via de administração mais próxima da prática clínica e evitando o processo de primeira passagem pelo fígado avaliamos se o 4-NC também possui eficácia quando administrado por via subcutânea. Neste ensaio piloto, foram utilizadas apenas 3 fêmeas BALB/c nude inoculadas com a mesma

linhagem de melanoma (SK-MEL-103) utilizada no experimento com administração intraperitoneal para diminuir as interferências na avaliação. O tratamento foi realizado 3X por semana durante 3 semanas (9 doses) injetados subcutaneamente no dorso do animal com 4-NC (n= 2) ou DMSO (n= 1).

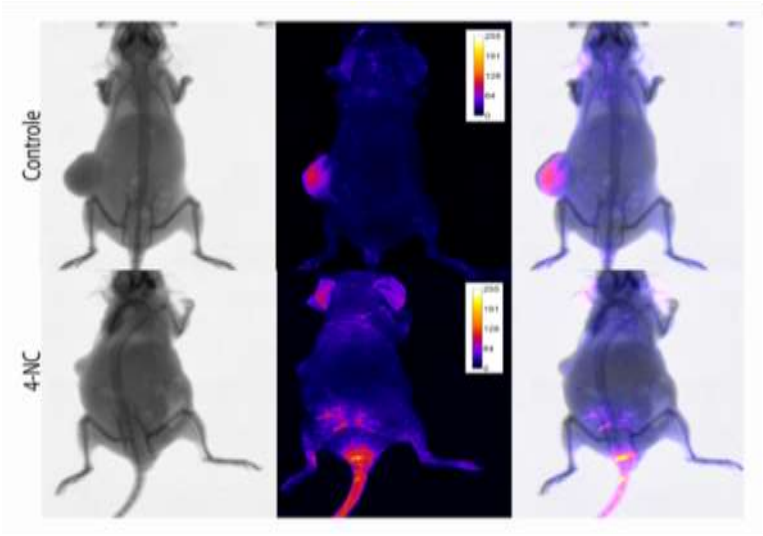
A foto representativa de 2 animais com seus respectivos tumores está apresentada na figura 63. É nítida a excelente resposta observada com o animal 4-NC I apresentando apenas 0,08 g de peso e 0,031 cm^3 de volume tumoral. Embora o animal 4-NC II não tenha apresentado uma resposta tão eficiente, o volume (0,425 cm^3) e o peso tumoral (0,630 g) após a dessecação demonstraram uma resposta parcial quando comparado ao controle DMSO (0,977 cm^3 e 1,250 g, respectivamente). Não foi possível a realização do PET/SCAN com estes animais em virtude de greve dos funcionários do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) no período das análises, porém as radiografias digitais e imagens obtidas pela fluorescência das linhagens SK-MEL-103 transfectadas com M-Cherry comprovam as diferenças observadas com o animal 4-NC I (Figura 64).

Figura 63. Potencial inibitório em modelos xenográficos tratados com 4-NC por via subcutânea



Fonte: Autoria própria. Foto representativa dos camundongos BALB/c *nude* injetados com células de melanoma humano (SK-MEL-103); os animais foram tratados com DMSO (C. DMSO I) ou com 10 mg/kg de peso corpóreo de 4-NC (4-NC I), demonstrando as diferenças no peso e volume tumoral entre os grupos. Os quadros apresentam o peso e volume tumoral observados após a dessecação dos animais.

Figura 64. Radiografias digitais e imagens fluorescentes em modelos xenográficos tratados com 4-NC



Radiografias digitais e imagens fluorescentes obtidas com o equipamento MSFX in vivo PRO. Camundongos *BALB/c nude* injetados com células de melanoma humano, SK-MEL-103: animal tratado com DMSO (C. DMSO I) e animais tratados com 10 mg/kg de peso corpóreo de 4-NC (4-NC I). As imagens foram realizadas um dia antes do sacrifício dos animais. O tumor do animal 4-NC I não aparece fluorescente devido ao limite de detecção do equipamento. As imagens foram obtidas pelo técnico Walter Turato.

Conforme observado no ensaio toxicológico, as análises da medula óssea e hemograma realizadas com a colaboração da aluna Araceli Hastreiter do laboratório de Hematologia (FCF/USP) identificaram diminuições nas porcentagens de Células Tronco Hematopoéticas (CTH, 55%), Progenitoras Hematopoéticas (HP, 55%), Progenitoras Linfóides (PL, 59%), Progenitora Mielóide Comum (CMP, 28%), Progenitoras Granulócitos e Monócitos (GMP, 44%) e Progenitoras Eritróide e Megacariótico (MEP, 32%) nos animais tratados com 4-NC, porém o número de animais neste ensaio foi muito pequeno para avaliar a significância destas alterações. Curiosamente, o número de linfócitos B, granulócitos e monócitos apresentaram pequena diminuição apenas para o animal 4-NC I que respondeu muito bem ao tratamento (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação das Células Tronco Hematopoéticas (CTH) (%)*

Amostra	Viabilidade	CTH	HP	PL	CMP	GMP	MEP	GRAN	MONO	ERIT	LINFO B
DMSO	97,4	0,076	0,57	0,32	0,3	1,94	0,39	33,3	2,58	22,5	2,39
4NCI	95,8	0,021	0,3	0,14	0,22	0,99	0,23	25,9	2,07	22,8	1,7
4NCII	96,5	0,047	0,21	0,12	0,21	1,19	0,3	32,7	2,88	20	2,82

Fonte: Autoria própria. *Os valores foram expressos em %. Células Tronco Hematopoéticas (CTH), Progenitoras Hematopoéticas (HP), Progenitoras Linfóides (PL), Progenitora Mielóide Comum (CMP), Progenitoras Granulócitos e Monócitos (GMP), Progenitoras Eritróide e Megacariótico (MEP), Granulócitos (GRAN), Monócitos (MONO), Eritrócitos (ERIT) e Linfócitos B (LINFO B).

Embora o hemograma tenha apresentado valores fora do intervalo de referência para maioria das análises, estes valores não foram diferentes quando comparados com o controle DMSO, exceto para leucócitos e plaquetas que estavam diminuídos nos animais tratados com 4-NC, mas o número de animais foi pequeno para identificar a significância destas diferenças (Tabela 10). É importante ressaltar que as referências foram baseadas em camundongos macho da espécie BALB/c (SANTOS et al., 2016).

Tabela 10. Análise de hemograma obtido a partir do sangue total

Amostra	Leucócitos ($10^3/mm^3$)	Hemácias ($10^6/mm^3$)	Hemog (g/dL)	Hemat (%)	Plaquetas ($10^3/mm^3$)	VCM (fm^3)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Contagem TNC MO ($x10^7/mL$)
Valores de Referência	1.5-4,8	7,1-9,5	11,6 – 15,8	37,4-51,7	325-888	41,5-57,4	14,1-18,4	30,5-34,2	
DMSO	5,2	6,65	11,3	30,6	582	46	17,0	36,9	5,08
4NCI	1,1	6,58	11,1	31,8	202	48	16,9	35,0	4,70
4NCII	1,4	6,63	10,2	28,6	489	43	15,4	35,7	4,13

Fonte: Autoria própria. *Hemoglobina (Hemog); Hematócrito (Hemat); Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Célula Nucleada Total (TNC) e Medula Óssea (MO). Valores de referência segundo Santos et al., 2016.

5.2.4 Ensaio Tumorigênico para células resistentes

O intuito dos próximos ensaios foi a utilização de células resistentes nos ensaios xenográficos e para isso, foram utilizados 3 animais (camundongos BALB/c nude). Primeiramente, o mesmo protocolo executado nos ensaios anteriores foi utilizado para inoculações subcutâneas das células de melanoma SK-MEL-29 R ($5x10^5$ células/animal). A observação diária dos animais não demonstrou o aparecimento dos nódulos tumorais mesmo após 1 mês de acompanhamento. De

acordo com Phadke, Sini & Smalley (2015) de quatro linhagens de melanoma testadas (BRAF mutado), somente duas (1205Lu e 1205 Lu R) formaram xenográficos em camundongos SCID sem o tratamento contínuo do inibidor de BRAF. Em seguida, os mesmos animais foram utilizados para nova inoculação destas células com um novo protocolo com mais células ($2,5x10^6$) em meio rico (matrigel, HEPES e meio L15) (PHADKE, SINI & SMALLEY, 2015). Após aproximadamente mais 2 meses, os animais ainda não apresentaram nódulos subcutâneos, mas demonstraram muito caquexia, o que nos levou a sacrificar os animais (Figura 65). No momento da necropsia foram observadas algumas machas escuras nos pulmões dos animais (Figura 66), podendo ser em decorrência do método de sacrifício (Câmara de CO_2) ou ainda em virtude ao aparecimento de possíveis metástases pulmonares devido a linhagem SK-MEL-29 R ser muito pigmentada. A análise dos pulmões por imunohistoquímica com anticorpo anti-melanoma (HMB45 + MC2-7C10 + M2-9E3) demonstrou a presença de células marcadas indicando que as células resistentes SK-MEL-29 não foram capazes de formar tumores subcutâneos, mas formar metástases (Figura 67). Outras análises mais específicas estão sendo feitas para confirmar nossos achados. Também foram analisadas lâminas de fígado, mas não foram identificadas marcações para presença de melanoma.

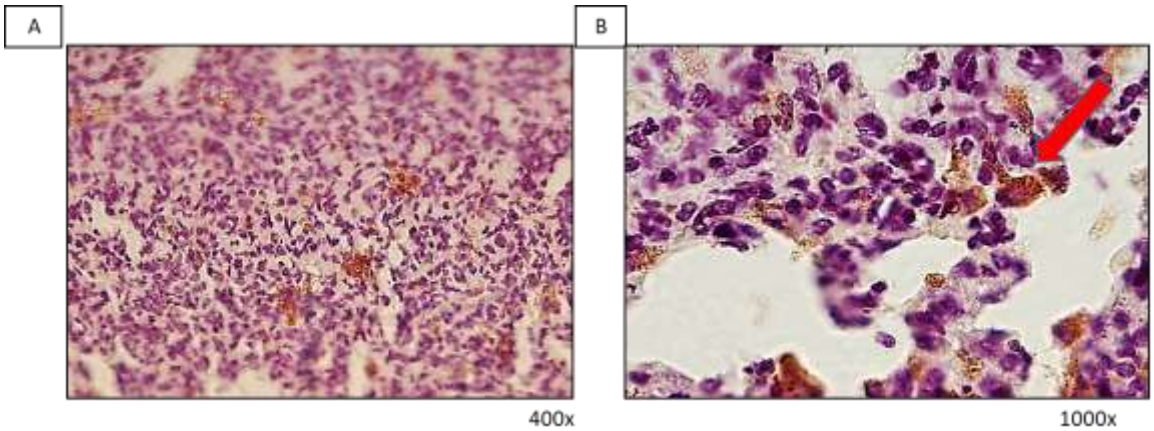
Figura 65. Ausência de nódulos tumorais e caquexia em ensaio piloto xenográficos inoculados com células de melanoma resistente SK-MEL-29 R

Fonte: Autoria própria. Os animais foram sacrificados após aproximadamente 2 meses após a segunda inoculação por via subcutânea nos flancos direito e esquerdo.

Figura 66. Presença de manchas escuras (seta) nos pulmões dos animais submetidos ao ensaio piloto xenográfico com células de melanoma resistentes

Fonte: Autoria própria.

Figura 67. Fotomicrografia indicando a presença de células marcadas (anti-melanoma) nos pulmões dos animais submetidos ao ensaio piloto xenográfico com células de melanoma resistentes



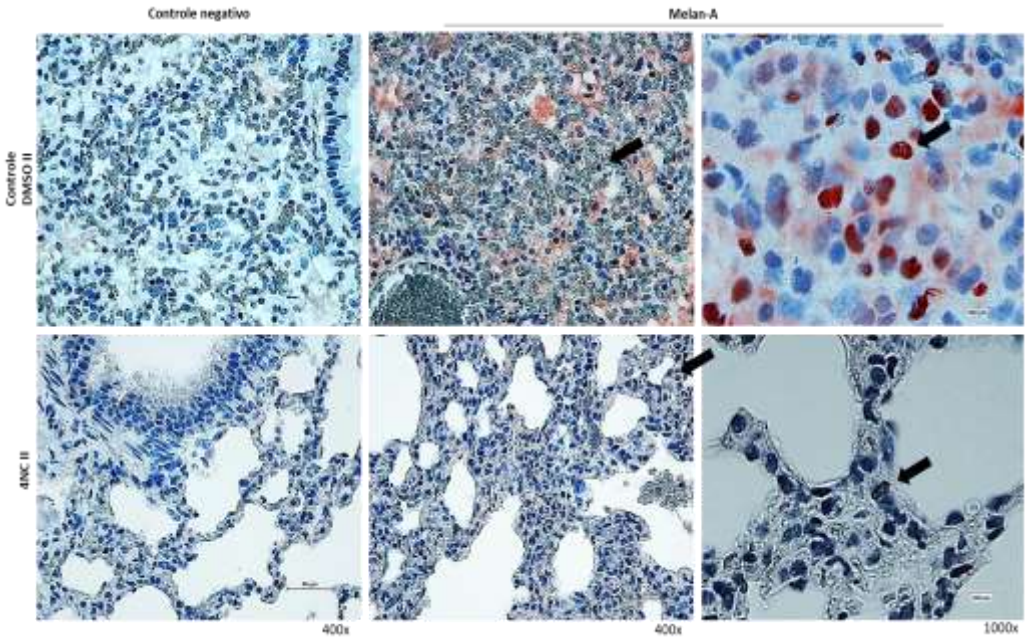
Fonte: Autoria própria. Imunohistoquímica com anti-melanoma nos pulmões dos animais submetidos ao ensaio xenográfico com células de melanoma resistentes SK-MEL-29. Aumento de 400x em A e de 1000x em B.

Pensando na possibilidade da linhagem SK-MEL-29 ser a responsável pelo não aparecimento do tumor subcutâneo, uma nova linhagem foi testada em um novo experimento. Mais 10 animais foram inoculados com células SK-MEL-28 resistentes (n= 8) e duplo-resistentes (n= 2). As células duplo-resistentes foram inoculadas 1 mês antes das células resistentes e após ter passado 1 mês da última inoculação (SK-MEL-28 R), novamente nenhum animal apresentou tumor subcutâneo. Foi decidido tratar estes animais com 4-NC (10 mg/kg) ou DMSO, para avaliar o potencial do 4-NC na inibição de possíveis metástases.

Após o tratamento com 9 doses, os tecidos de pulmão, fígado e cérebro foram coletados para análise de imunohistoquímica e as lâminas foram levadas para o laboratório da Dra. Ashani T. Weeraratna para a realização dos experimentos. O anticorpo Melan-A (DAKO) foi utilizado nesta etapa em virtude da prévia análise ter sido realizada com o anticorpo anti-melanoma (HMB45 + Melan-A) e, além disso,

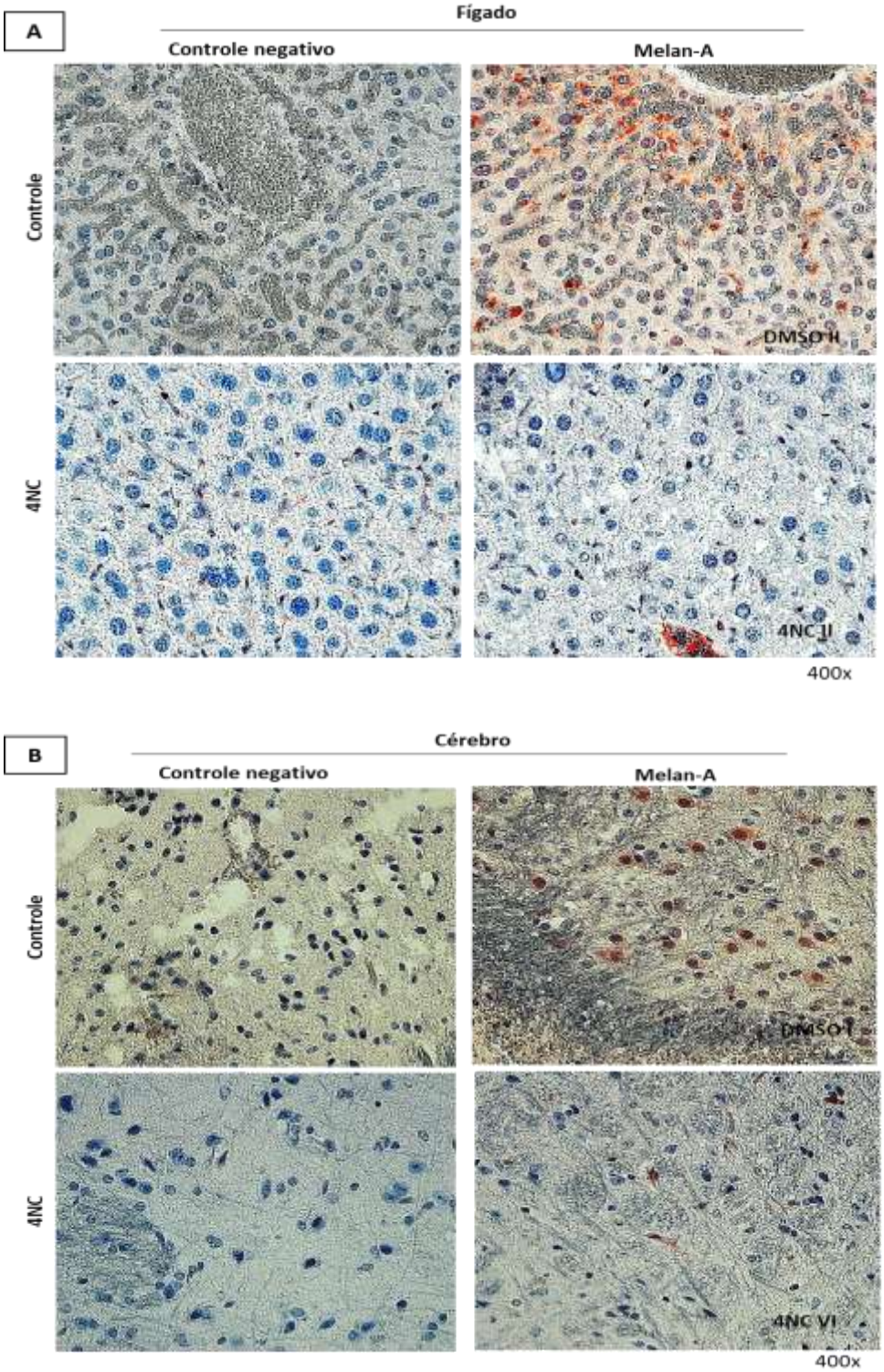
Chen et al., (1996) mostraram que MART-1 (clone 103), proteína detectada com anti-Melan-A, é superexpressa nas linhagens de melanoma SK-MEL-28. Inicialmente foram encontradas muitas marcações nas lâminas de pulmão dos controles tratados com DMSO e pouca marcação nos animais tratados com 4-NC. Embora haja um pouco de coloração de fundo nestas lâminas, o controle negativo do experimento (lâmina sem anticorpo primário) praticamente não apresenta marcações. Em primeira análise pelo Dr. Aloisio Souza Felipe da Silva (patologista do Departamento de Patologia e Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo - HU/USP), foi identificada a possibilidade de serem marcações inespecíficas do anticorpo a outros tipos celulares, talvez células do sistema imune. Isso porque não foi possível identificar massas tumorais nas lâminas e sim células individuais marcadas (Figura 68). O mesmo foi observado para as lâminas de fígado (Figura 69 A) e cérebro (Figura 69 B) destes animais. De qualquer forma, novas análises estão sendo realizadas para avaliação dos achados.

Figura 68. Fotomicrografias indicando a presença de células marcadas inespecificamente (anti-Melan-A) nos pulmões dos animais do ensaio xenográfico com células SK-MEL-28 R



Fonte: Autoria própria. Imunohistoquímica com anti-Melan-A nos pulmões dos animais submetidos ao ensaio xenográfico com células de melanoma SK-MEL-28 R. O controle negativo foi realizado como controle do experimento na ausência do anticorpo primário. As setas indicam as células marcadas inespecificamente. Aumento de 400 e 1000x.

Figura 69. Fotomicrografia do fígado e cérebro dos animais do ensaio xenográfico com células SK-MEL-28 R indicando a presença de células marcadas inespecificamente (anti-Melan-A)



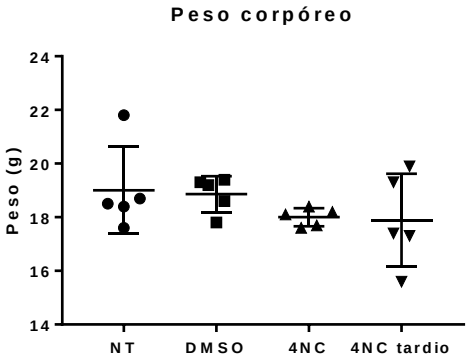
Fonte: Autoria própria. Imunohistoquímica com anti-Melan-A nos fígados (A) e cérebro (B) dos animais submetidos ao ensaio xenográfico com células de melanoma SK-MEL-28 R. O controle negativo foi realizado como controle do experimento na ausência do anticorpo primário. Aumento de 400x.

5.2.5 Ensaio Toxicológico para avaliação da administração do 4-NC por via subcutânea

Visando a complementar os ensaios *in vivo* realizamos um ensaio toxicológico com o mesmo regime de doses dos ensaios xenográficos. Foram realizadas análises histopatológicas de tecidos selecionados, hemograma, mielograma, análise celular da medula óssea por citometria de fluxo e análise de algumas enzimas do sangue marcadoras de lesáo hepática e marcadores de lesáo renal. A via subcutânea foi avaliada por ser mais próxima da prática clínica.

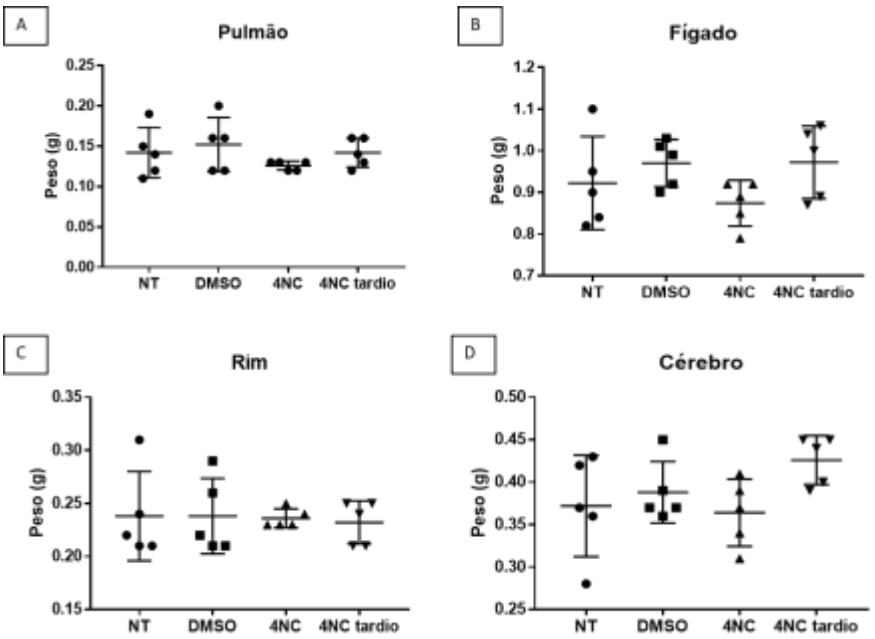
Não houve diferença significante (p= 0,3949) de peso corpóreo dos animais entre os grupos NT (não tratado), DMSO, 4-NC e 4-NC tardio, sacrificado 1 mês após a administração da última dose (Figura 70). A pesagem dos órgãos no dia da eutanásia também não indicou diferenças significantes para o pulmão (Figura 71 A – p= 0,4408), fígado (Figura 71 B – p= 0,22), rim (Figura 71 C – p= 0,9668) e cérebro (Figura 71 D – p= 0,1435). A análise histopatológica de cortes corados por Hematoxilina-Eosina realizada pelo Prof. Dr. Aloisio Souza Felipe da Silva (HU/USP) não revelou alterações nos pulmões e rins quando comparados com os controles NT e DMSO (Figura 72). Os cérebros apresentaram alguns núcleos picnóticos em todos os grupos, incluindo os animais do grupo controle NT e DMSO, possivelmente em virtude de uma reação hipóxico-isquemica, podendo ter ocorrido pelo método de sacrifício utilizado (Figura 73). Células com citoplasma mais claro demonstrando edema celular foram observadas nos hepatócitos dos animais tratados com DMSO e 4-NC e curiosamente, que se agravaram nos animais tratados com 4-NC sacrificados tardiamente. Quando observados em maior aumento (1000x), o fígado dos animais não tratados também apresentou este tipo de alteração menos intensa (Figura 74). Não foram observadas alterações de morte celular nas lâminas analisadas.

Figura 70. Análise do peso corpóreo dos animais no dia da eutanásia



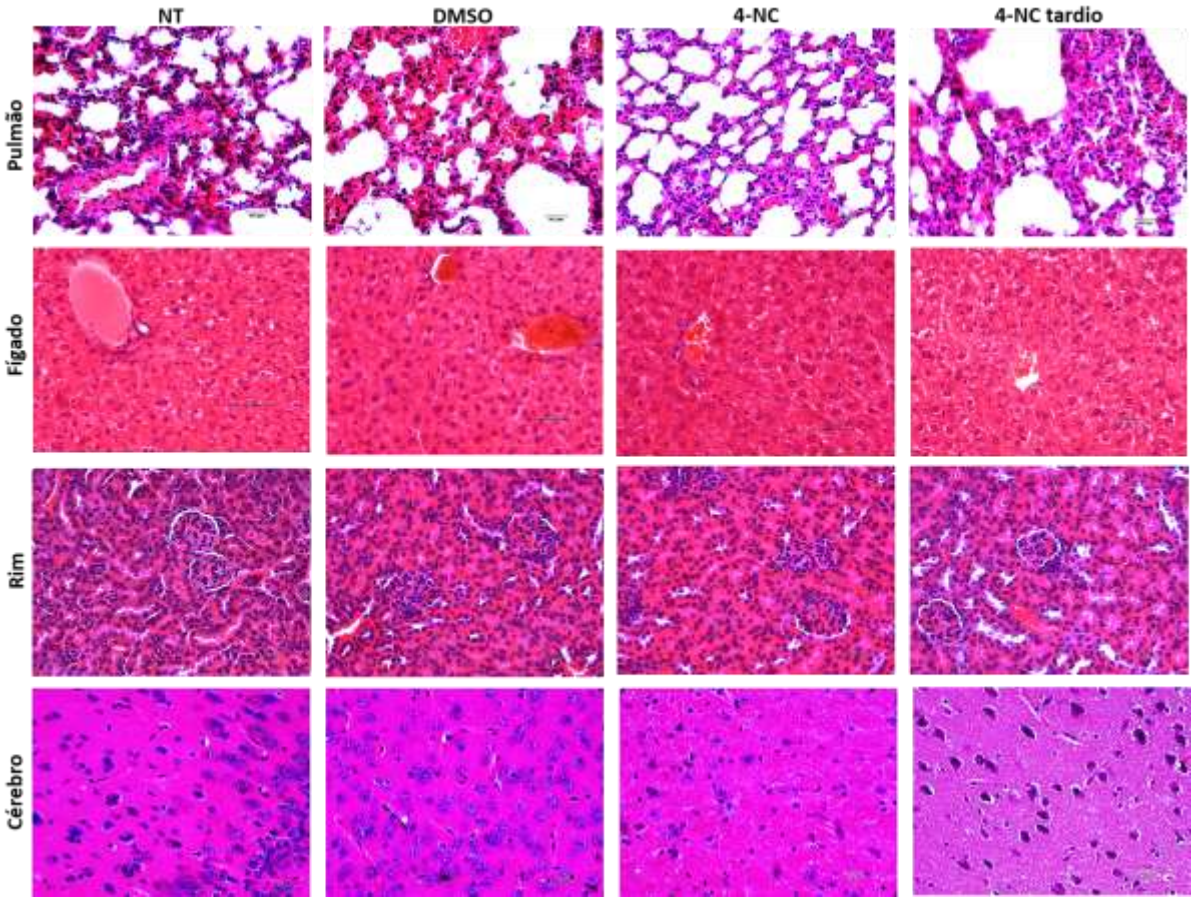
Fonte: Autoria própria. Animais do ensaio toxicológico: sendo 5 animais por grupo - animais não tratados (NT) e tratados com DMSO/H_2O (20%), 10 mg/kg de 4-NC (1:5) e 4-NC tardio (sacrificado 30 dias após a última dose).

Figura 71. Pesagem dos órgãos dos animais do ensaio toxicológico no dia da eutanásia



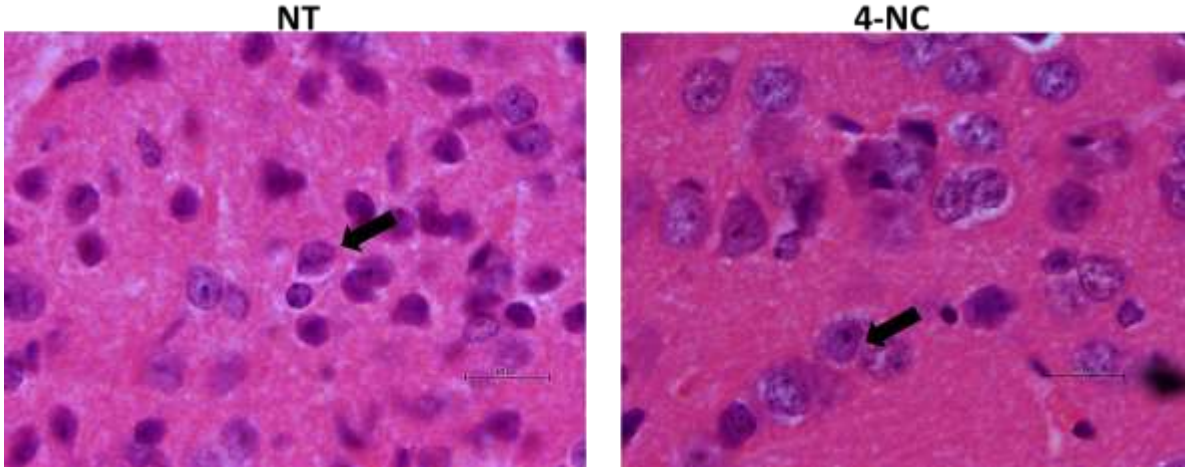
Fonte: Autoria própria. Animais do ensaio toxicológico: sendo 5 animais por grupo - animais não tratados (NT) e tratados com DMSO/H_2O (20%), 10 mg/kg de 4-NC (1:5) e 4-NC tardio (sacrificado 30 dias após a última dose).

Figura 72. Análise histopatológica dos pulmóes, rins, fígado e cérebro no dia da eutanásia



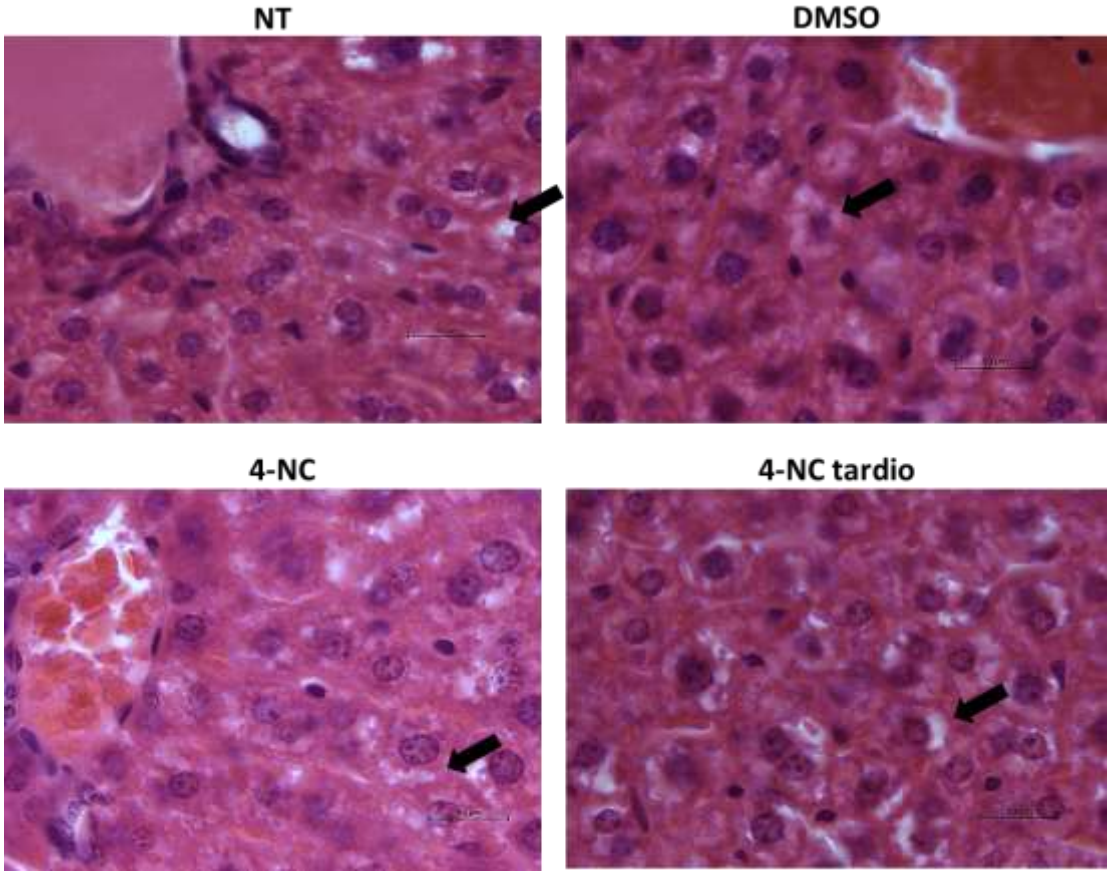
Fonte: Autoria própria. Animais do ensaio toxicológico: sendo 5 animais por grupo - animais não tratados (NT) e tratados com DMSO/H_2O (20%), 10 mg/kg de 4-NC (1:5) e 4-NC tardio (sacrificado 30 dias após a última dose). Aumento de 400x.

Figura 73. Fotomicrografias representativas do cérebro dos animais NT e 4-NC demonstrando a presença de núcleo picnóticos



Fonte: Autoria própria. *Animal não tratado (NT) e tratado com 10 mg/kg de 4-NC; as setas pretas indicam a visualização de núcleos picnóticos em todos os grupos, sendo representadas pelos animais não tratados (NT) e tratados com 4-NC. Aumento de 1000x.

Figura 74. Fotomicrografias representativas do fígado dos animais do ensaio toxicológico demonstrando a presença de edema celular



Fonte: Autoria própria. Animais do ensaio toxicológico: sendo 5 animais por grupo - animais não tratados (NT) e tratados com DMSO/H_2O (20%), 10 mg/kg de 4-NC (1:5) e 4-NC tardio (sacrificado 30 dias depois); as setas pretas indicam a visualização de edema celular nos grupos DMSO, 4-NC e 4-NC tardio. Aumento de 1000x.

Quando analisados os níveis enzimáticos no soro, a fosfatase alcalina demonstrou pequena diminuição que só foi significante nos animais 4-NC tardios. De qualquer forma, os níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) permaneceram dentro da faixa de normalidade. Estas enzimas avaliam danos na membrana dos hepatócitos, resultando em aumento da permeabilidade e consequentemente liberação para a corrente sanguínea. A atividade da gama glutamil transferase (GGT) foi indetectável em todos os grupos. Os níveis de uréia se mostraram aumentados somente nos animais do grupo 4-NC tardio o que poderia ser um indicativo de disfunção renal, porém os níveis de creatinina estavam normais, sendo que esta última é mais específica e como marcador de lesão renal (Figura 75).

Na contagem de células da medula óssea por imunofenotipagem em citometria de fluxo, a análise de células progenitoras indicou diminuição nas células-tronco hematopoiéticas e progenitoras linfoides nos animais tratados com 4-NC com

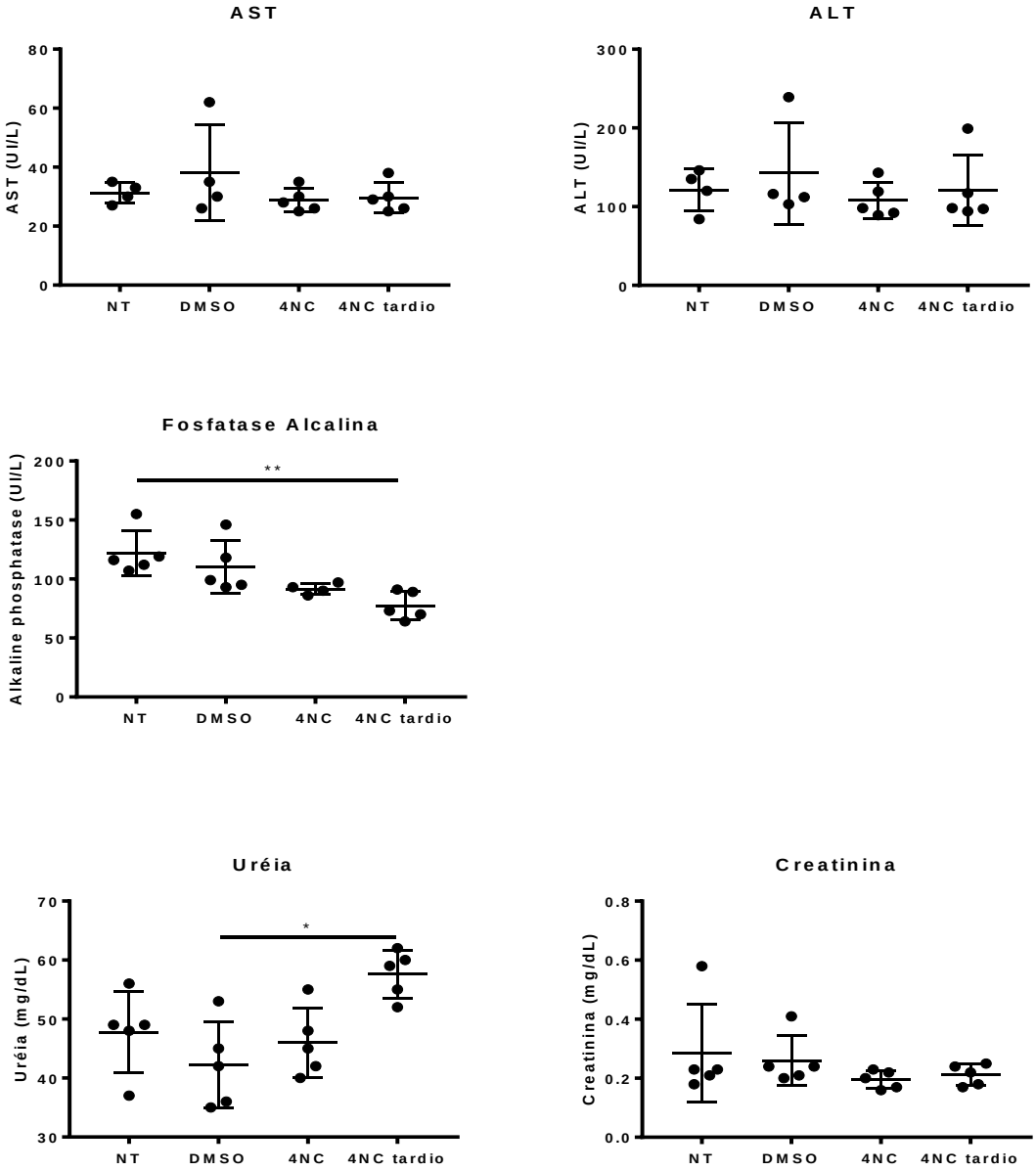
leve recuperação no grupo 4-NC tardio. Os progenitores hematopoiéticos estavam apenas aumentados no grupo 4-NC tardio e os progenitores mielóides mantiveram-se sem alteração nos animais tratados (Figura 76). O 4-NC parece estimular a produção de granulócitos na medula óssea e uma resposta anti-inflamatória em eritrócitos e leucócitos agranulocíticos, como monócitos/macrófagos, linfócitos T (CD4 e CD8) e células Natural Killers (NK) (Figura 77). Não houve citotoxicidade na viabilidade dos linfócitos T e B (Figura 78). Além disso, o número de leucócitos agranulocíticos mostrou aumento significativo no grupo tardio 4-NC, enquanto os eritrócitos e mono/macrófagos permaneceram em níveis baixos. Na maioria dos casos, esse aumento mostrou uma tendência de recuperação após 30 dias do último tratamento, às vezes exacerbado.

A contagem do número de plaquetas foi significante ($p \leq 0,01$) aumentada no grupo 4-NC quando comparada ao controle NT. O grupo 4-NC tardio novamente demonstrou uma diminuição do número de plaquetas, mas esta diferença ainda não foi suficiente para alcançar os níveis normais ($p \leq 0,05$) (Figura 79). Embora significante estas diferenças comparadas aos controles, ainda estão dentro dos valores de referência para camundongos BALB/c (intervalo de 325-888 $x10^3/mm^3$) publicados por Santos et al., (2016).

O hemograma também mostrou hemoglobina levemente aumentada no grupo 4-NC (Figura 80). A contagem diferencial de leucócitos totais (absolutos) não demonstrou citotoxicidade 4-NC em leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos presentes no sangue periférico, mostrando o efeito 4-NC apenas na medula óssea (Figura 81).

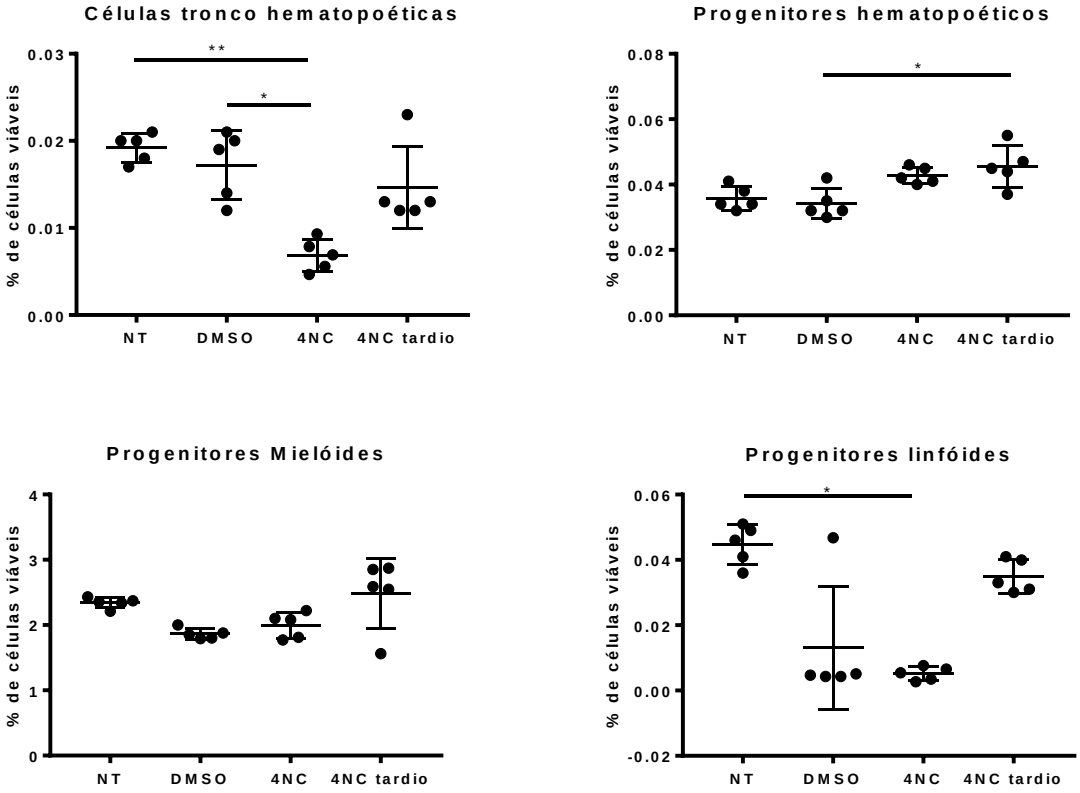
A análise diferencial microscópica e morfológica (mielograma) não demonstrou alterações no número de blastos, megacariócitos (basofílicos e acidofílicos), monócitos, linfócitos, granulócitos jovens (promeleloblastos, mieloblastos e metamieloblastos), granulócitos (bastonetes segmentados, eosinófilos e basófilos), eritrócitos jovens (proeritroblastos e eritroblastos basófilos) e eritrócitos maduros (policromáticos e ortocromáticos) (Figura 82).

Figura 75. Análise de parâmetros bioquíimicos no sangue de todos animais do ensaio toxicológico



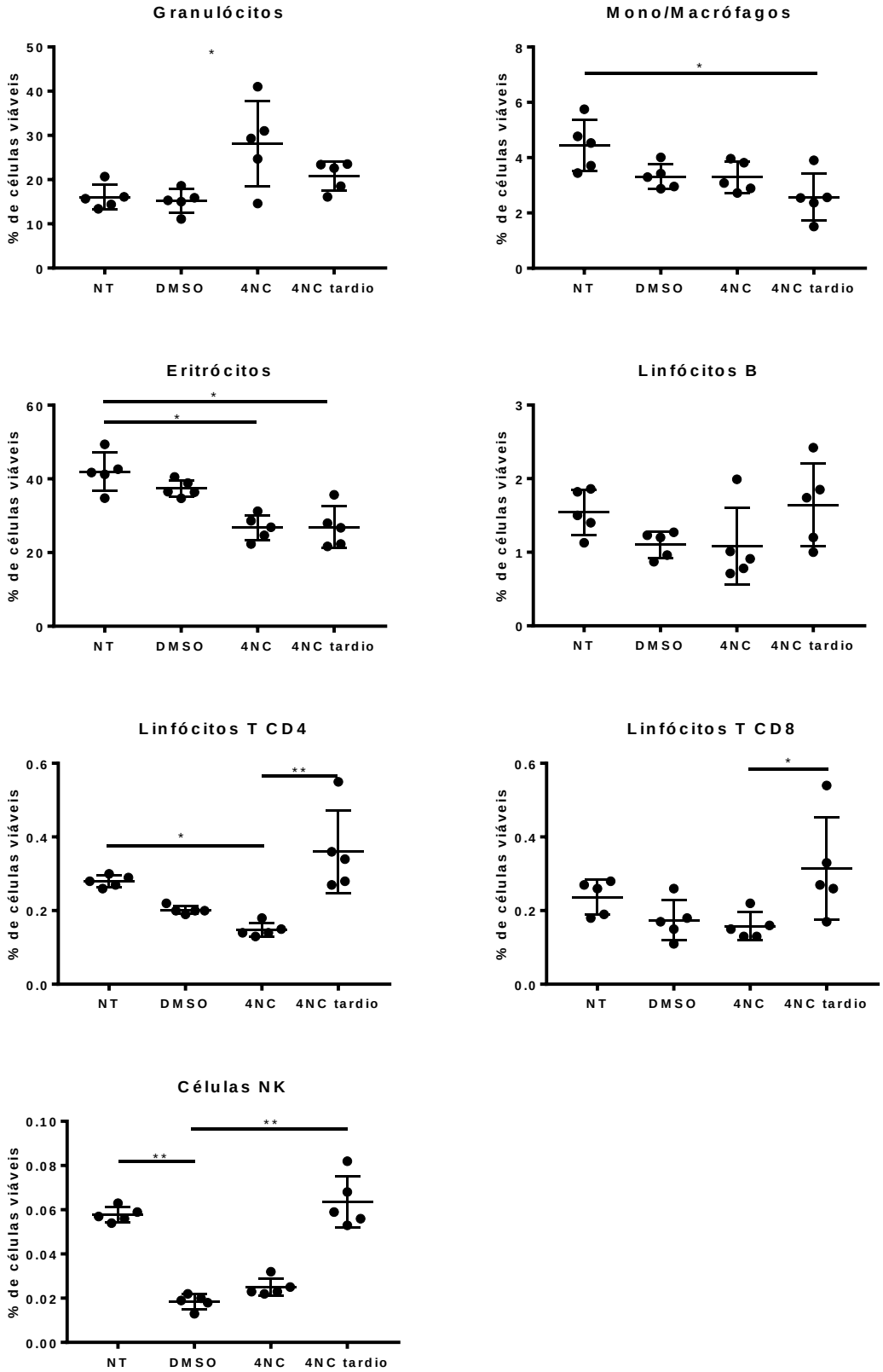
Gráficos elaborados em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter. AST – Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina amonitransferase; *p≤ 0,05; ** p≤ 0,01.

Figura 76. Contagem de células progenitoras da medula óssea por citometria de fluxo



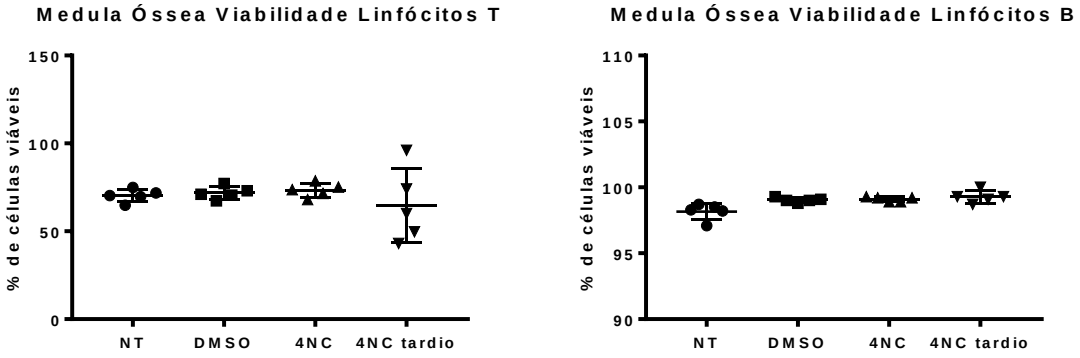
Gráficos elaborados em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter. *p≤ 0,05; ** p≤ 0,01

Figura 77. Contagem de células presentes na medula óssea dos animais por citometria de fluxo



Gráficos elaborados em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter. *p≤ 0,05; ** p≤ 0,01

Figura 78. Viabilidade dos Linfócitos T e B presentes na medula óssea



Gráficos elaborados em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter

Figura 79. Contagem de plaquetas presentes nos animais após o ensaio toxicológico

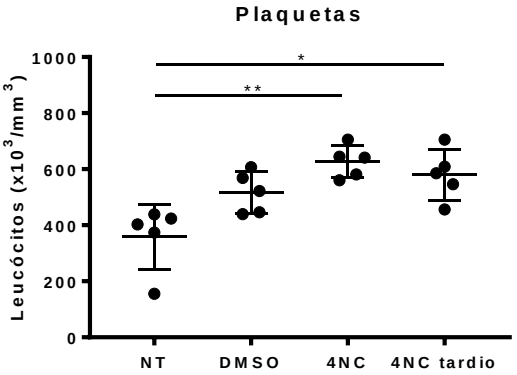
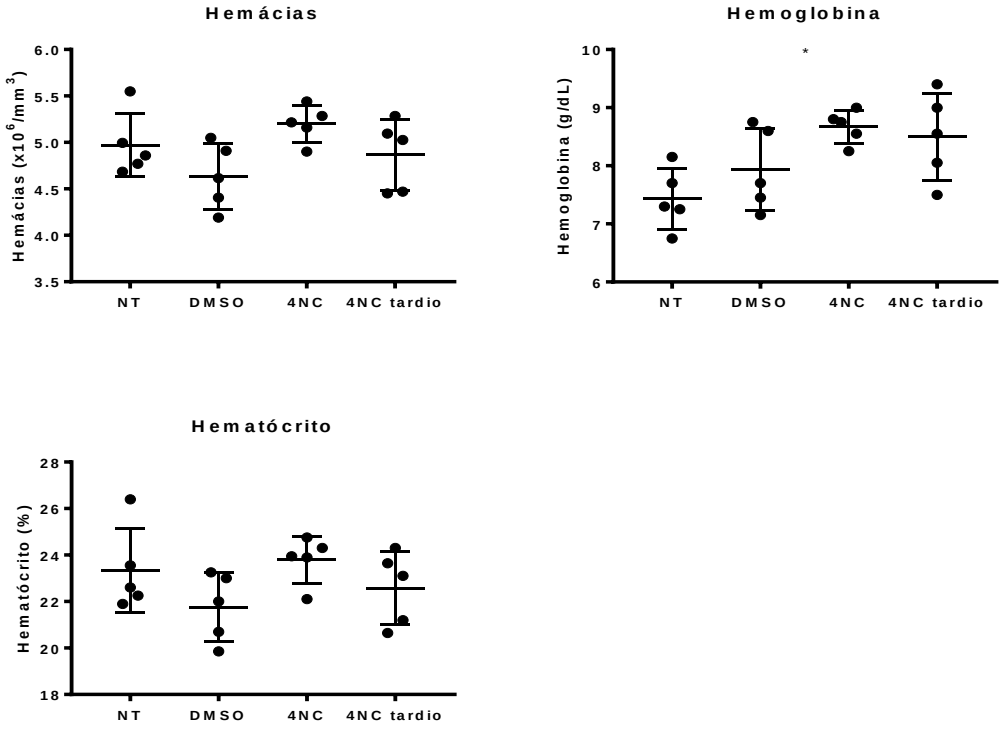


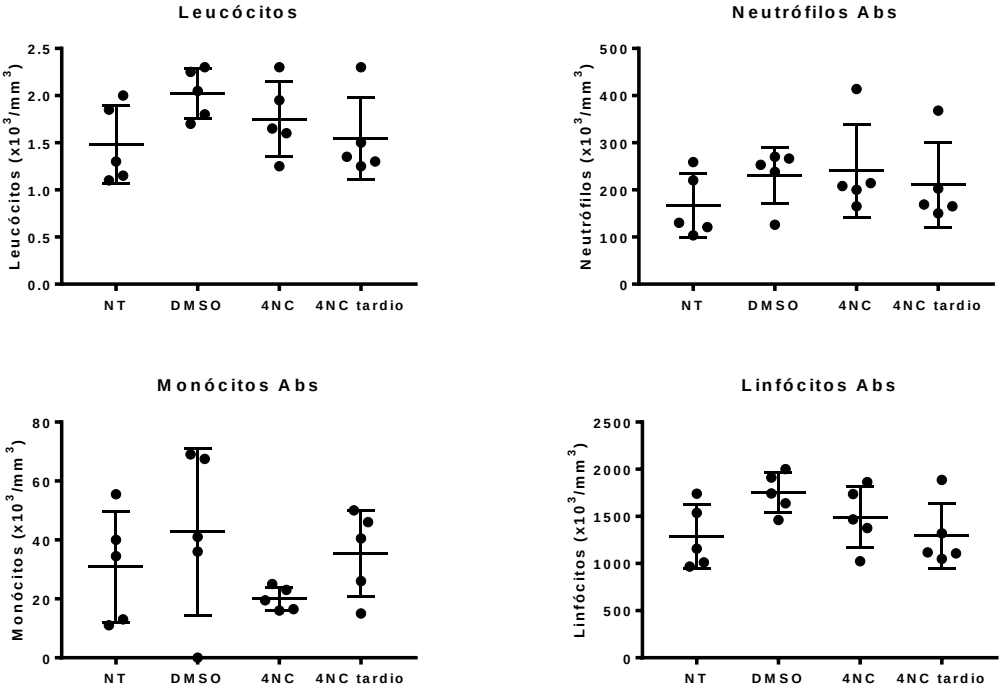
Gráfico elaborado em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter. *p≤ 0,05; ** p≤ 0,01

Figura 80. Parâmetros hematológicos (série vermelha) dos animais ao final do ensaio toxicológico



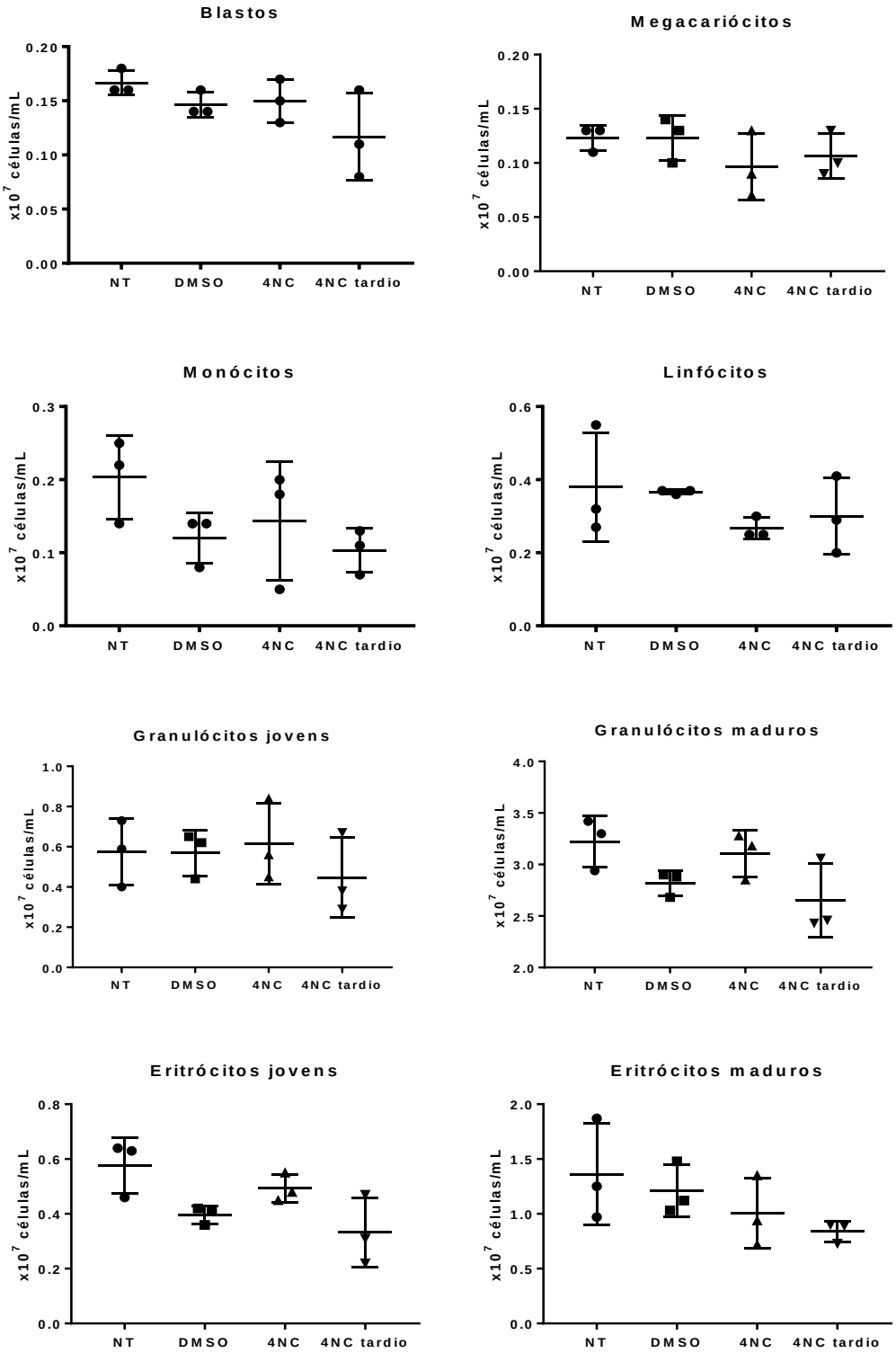
Gráficos elaborados em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter. *p≤ 0,05

Figura 81. Contagem do número absoluto (Abs) de leucócitos e suas diferentes populações (neutrófilos, linfócitos e monócitos) em sangue periférico dos animais ao final do ensaio toxicológico



Gráficos elaborados em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter. *Abs – número absoluto de células;

Figura 82. Contagem dos diferentes tipos celulares da medula óssea (Blastos, Megacariócitos, Monócitos, Linfócitos, Granulócitos jovens e maduros e Eritrócitos jovens e maduros)* dos animais ao final do ensaio toxicológico



Gráficos elaborados em colaboração com a aluna Araceli Hastreiter. *Contagem por mielograma: Blastos, Megacariócitos (basófilos + acidófilos), Monócitos, Linfócitos, Granulócitos jovens (promielócitos + mielócitos + metamielócitos), Granulócitos (Bastonetes + segmentados + eosinófilos + basófilos), Eritrócitos jovens (proeritroblastos + eritroblastos basófilos) e Eritrócitos maduros (pilocromáticos + ortocromáticos).

6. DISCUSSÃO

Inicialmente, foram geradas as células duplo-resistentes (DR) aos inibidores de $BRAF^{V600E}$ (vemurafenibe) e de MEK (trametinibe) a partir de células resistentes. Durante o processo de geração, as linhagens demonstraram comportamentos diferentes, como o aparecimento de pigmentação na SK-MEL-29 R e DR, que é característica muito marcante de resistência. Cultura de células BRAF mutantes (UACC-257) tratadas com PLX4720 por 72h levou à pigmentação aumentada, demonstrando o essencial papel de MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) na pigmentação e síntese de melanina (HAQ et al., 2013). MITF é o principal regulador de melanócitos com papel chave no desenvolvimento, diferenciação, função e sobrevivência (HSIAO & FISHER, 2014). Já foi demonstrado que a fosforilação de p38 (COT), outra proteína da subfamília MAPK, pode ativar MITF que regula a expressão de tirosinases, como TRP1 e TRP2 (*Tyrosinase-related protein 1* e *2*), desta forma induzindo a produção de melanina (SMALLEY, EISEN, 2000; SAHA et al., 2006; HIRATA et al., 2007). Este fenômeno de melanogênese aumentada já foi descrito como um mecanismo de resistência a quimioterápicos em células de melanoma (B16-F0) apoptóticas com o intuito de retardar a sua própria morte (PINON et al., 2011). Calianese et al., (2013) descreveu que células de melanoma tratadas com peróxido de oxigênio (H_2O_2 – um dos produtos tóxicos liberados na melanogênese) induzem a superexpressão de melanina como proteção e que juntamente com a ativação das vias de sinalização MEK/ERK e AKT/mTOR contribuem para a resistência a este estresse oxidativo e levam à agressividade do melanoma. Já foi demonstrado que a TRP2, uma enzima melanogênica, confere resistência à cisplatina em células de melanoma (CHU et al., 2000). A melanogênese é um processo extremamente tóxico e com o auxlio do sistema transportador ABC (*ATP-binding cassete*) e dos melanossomas, podem ser responsáveis pela captura e efluxo das drogas em células de melanoma, favorecendo sua resistência. O sistema ABC é composto por proteínas integrais de membrana responsáveis pelo transporte de moléculas e, através desta auxilia na detoxificação nos melanócitos e os melanossomas são organelas derivadas de lisossomos modificados para a síntese de melanina (CHEN et al., 2009).

Desta forma, foram geradas 3 novas linhagens celulares, sendo a SK-MEL-19 DR (IC_{50} = 650nM de trametinibe) e SK-MEL-29 DR (IC_{50}= 460nM) consideradas

com dupla resistência adquiridas e uma terceira, a SK-MEL-28 DR (IC_{50} > 800nM) com resistência intrínseca somente ao trametinibe. Uma vez geradas tais células, ensaios de viabilidade (MTT) com vemurafenibe e com diferentes concentrações de trametinibe foram desenvolvidos para confirmação desta dupla-resistência. A linhagem SK-MEL-28 parental é caracterizada por apresentar além da mutação $BRAF^{V600E}$, também amplificação em MITF e CCND1, CDKN2A -/+, PTEN -/+ e EGFR mutado (P753S) (NIEHR et al., 2011). Como falado anteriormente, MITF tem sido definido como o maior regulador de desenvolvimento, diferenciação e pigmentação dos melanócitos (FLAHERTY et al., 2012); CCND1 codifica para ciclina D1, que são reguladores de CDKs (quinases dependentes de ciclinas) participantes do ciclo celular; CDKN2A codifica as proteínas p16 e p14, que são supressores tumorais; PTEN também é um supressor tumoral que regula a via PI3K-AKT. Já foi descrito também que esta linhagem possui mutação pontual em p53, códon 145 e sequência trocada de TGT para GTT, o que torna a proteína inativa (O'CONNOR et al., 1997). Além disso, nossos resultados confirmaram superexpressão de EGFR total e fosforilado para as linhagens resistentes e duplo-resistentes, justificando a resistência intrínseca identificada para esta linhagem.

Com o ensaio de western blotting a dupla-resistência adquirida das linhagens foram caracterizadas por reativação da via MAPK, sendo demonstrada superexpressão a partir de BRAF para a SK-MEL-29 DR e de MEK para SK-MEL-19 DR. A superexpressão de p-MEK e p-ERK estão de acordo com a literatura (WAGLE et al., 2014; LU et al., 2017). Análises de sequenciamento de RNA (*Whole-transcriptome sequecing – RNA-seq*) e de DNA (*whole-exome sequencing – WES*) em pacientes com resistência adquirida aos inibidores de BRAF e MEK demonstraram que 3 de 5 pacientes apresentaram reativação da via MAPK, onde 2 pacientes apresentaram alterações em B-RAF (*splice* alternativo e amplificação) e 1 apresentou uma nova mutação em MEK ($MEK2^{Q60P}$) (WAGLE et al., 2014). Uma mutação em MEK já havia sido descrita, a MEK^{C121S} por Wagle et al., (2011). Embora nesta etapa não tenham sido analisadas as proteínas da via de sinalização MAPK *upstream* de BRAF (como RAS e receptores de tirosina quinase - RTK), já foi possível observar que a partir da proteína BRAF (SK-MEL 19 DR) ou MEK (SK-MEL 29 DR) houve reativação na via, sendo um indício de que a duplo-resistência desta linhagem pode ser por alteração destas próprias proteínas.

Embora, estes resultados confirmem a resistência alcançada aos inibidores de BRAF e de MEK por reativação da via MAPK nestas linhagens de melanoma, a aprovação por parte da FDA permitindo a terapia combinatória com inibidores de BRAF e MEK (dabrafenibe + trametinibe) como tratamentos de primeira linha (FDA, 2015), modificou nosso desenho experimental de forma a conseguir linhagens duplo-resistentes que mimetizem fidedignamente o que acontece com o paciente em tratamentos atuais. As linhagens duplo-resistentes caracterizadas anteriormente foram geradas a partir de linhagens já resistentes ao vemurafenibe, como era feito com os pacientes de melanoma que recebiam tratamento com trametinibe após a progressão com inibidores de BRAF. Após a aprovação da terapia combinatória com os inibidores de BRAF e de MEK, novos experimentos foram realizados a partir de linhagens parentais, ou seja, *naive* para os tratamentos com os inibidores, desta forma representando uma plataforma *in vitro* fiel ao perfil *in vivo* para testes de terapias combinatórias.

Na etapa seguinte, novas linhagens foram geradas a partir de células parentais tratadas com a terapia combinatória (inibidores de BRAF e MEK) desde o início. Conforme observado anteriormente, as linhagens SK-MEL 19 e 29 demonstraram muita sensibilidade, gerando alta mortalidade desde o início dos tratamentos, o que dificultou a geração da dupla-resistência para estas linhagens. A linhagem SK-MEL 28 DR foi gerada com sucesso, demonstrando diferenças morfológicas de tamanho celular e arranjos do citoesqueleto que foram identificadas por microscopia de fluorescência. A importância das alterações morfológicas em decorrência do rearranjo das fibras do citoesqueleto juntamente com alta expressão de MMP-2 (SANDRI et al., 2016) contribuem para elevada invasividade observada para as linhagens SK-MEL 28 R e DR. Não há muitos trabalhos descrevendo características das células resistentes à terapia combinatória, mas a resistência ao BRAFi (vemurafenibe) é caracterizada por células menos diferenciadas, com menor proliferação, expansão do compartimento lisossomal, expressão aumentada de proteínas envolvidas com as vias de sinalização MAPK, metástases, migração celular, adesão, proteínas da matriz extracelular e apresentam expressão diminuída de proteínas envolvidas com reparo de DNA, ciclo celular, via de sinalização p53 e homeostase do sistema redox (PAULITSCHKE et al., 2015). Algumas destas características não foram avaliadas neste estudo, mas tanto as células resistentes quanto as duplo-resistentes (BRAFi/MEKi) compartilham as características de

células menos proliferativas (evidenciada pela diferença no número de colônias presentes nos controles no ensaio clonogênico - Figura 38), mais invasivas e com morfologia menos diferenciada, apresentando semelhanças com uma transição de um fenótipo epidérmico para um mesenquimal. Combinado com estas características, FAIÃO-FLORES et al., 2016 descreveram que as células resistentes (SK-MEL 28 R) apresentam também aumento na expressão de fatores de transcrição como GLI1/GLI2 (*Glioma-associated oncogene homolog 1 and 2*) que potencializam a invasão e processos metastáticos em virtude da alteração de moléculas da transição epitélio-mesequima. Todo o processo foi contido com o uso de GANT 61, um inibidor específico desta via. Alguns trabalhos mostram que a expressão de GLI1 pode modular diretamente a ativação de MMPs contribuindo para um perfil mais invasivo (FAN et al., 2014, 2016). A superexpressão de EGFR e de *activator of transcription 3* (STAT3), juntamente com a diminuição de expressão de MITF, como já descrito para a linhagem resistente (SK-MEL-28 R) (SANDRI et al., 2016; FAIÃO-FLORES et al., 2016), conferem um potencial mais agressivo e estimula a invasão destas células (GIROTTI et al., 2013; MULLER et al., 2014; KONIECZKOWSKI et al., 2014). Além disso, a expressão aumentada de EGFR pode estar associada com um fenótipo celular de proliferação lenta exibindo o *hallmarks* de senescência-induzida por oncongene (SUN et al., 2014) e conferindo vantagem para as células de melanoma mutadas para $BRAF^{V600E}$ (ZANG & HERLYN, 2014).

Novamente, a reativação da via MAPK foi identificada como via de resistência para a linhagem SK-MEL-28 com aumento de expressão de p-MEK, p-CRAF (S338), t-EGFR e p-EGFR, embora os receptores de tirosina quinase apresentem diminuição na expressão quando comparada com a linhagem resistente (SK-MEL-28 R). A expressão das proteínas p-ARAF e p-BRAF foi mais elevada nas células parentais, demonstrando o importante papel de p-CRAF nesta via de resistência. A principal via de resistência aos inibidores de BRAF é a reativação de MEK-ERK da via MAPK independente de BRAF (PARAISO et al., 2010; APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011), o que justificaria a utilização de um tratamento combinado com inibidores de BRAF e de MEK concomitantemente (SMALLEY et al., 2006; SMALLEY, FLAHERTY, 2009; PARAISO et al., 2010; YAGIMA et al., 2012; FLAHERTY, HODI, FISHER, 2012; FEDORENKO, GIBNEY, SMALLEY, 2013; GIBNEY et al., 2013). Embora hajam poucos trabalhos examinando a resistência alcançada à terapia combinada (BRAFi/MEKi), a reativação da via MAPK ainda é o mecanismo mais evidente com

maior proporção (82%) para os pacientes tratados com a combinação em comparação ao tratamento apenas com inibidor de BRAF (50%) (WELSH, et al., 2016). Porém, recentemente foi demonstrado que a resistência combinada de inibidores de BRAF/MEK pode apresentar um mecanismo distinto da resistência alcançada nos tratamentos com inibidores de BRAF em terapia única, com superativação da via de *p-21 activated kinases* (PAKs), podendo fosforilar diretamente p-CRAF (S338) e p-MEK (LU et al., 2017) corroborando exatamente com nossos achados para a linhagem DR. PAKs são proteínas kinases serina/treonina que funcionam *a* jusante de pequenas GTPases CDC42 e RAC1, e está envolvida em muitas vias tumorigênicas. (RADU et al., 2014). A via de PAK medeia a duplo-resistência modificando pelo menos quatro vias: 1) sustentando a atividade de JNK, porque JNK e ERK tem alvos *downstream* em comum como ELR1, JUN e FOS, desta forma, compensando a falta de ativação de ERK; 2) PAK e CRAF fosforilam BAD, que bloqueia sinalização apoptótica; 3) regulando a fosforilação de β-catenina; 4) provavelmente ativando a via de mTOR (LU et al., 2017).

Para a resistência aos inibidores de BRAF há muitas outras vias descritas que podem ser superativadas como COT (JOHANNESSEM et al., 2010), PI3K-AKT (APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011), EGFR (GIROTTI et al., 2013; SUN et al., 2014), PDGFRB (NAZARIAN et al., 2010; APLIN, KAPLAN, SHAO, 2011; SUN et al., 2014), favorecendo a proliferação e sobrevivência destas células. A eficácia limitada das terapias direcionadas tem sido atribuída também a citocinas específicas (*Therapy-induced secretome – TIS*) secretadas no microambiente tumoral, como IGF1 (*Insulin-like growth factor 1*), EGF (*Epidermal growth factor*), ANGPTL7 (*Angiopoietin-related protein 7*) e PDGFD (*Plateled derived growth factor D*) induzindo o aumento de AKT, aumentando a sobrevivência das células sensíveis ao tratamento, e ainda acelerando a expansão e disseminação dos clones resistentes (OBENAUF et al., 2015). A supressão de SOX10 em melanoma causa ativação da sinalização da via TGF-β, levando ao aumento de expressão de EGFR e PDGFRB, consequentemente aumentando a expressão de marcadores envolvidos com senescência (como β-galactosidase), conferindo resistência aos inibidores de BRAF e de MEK, o que demonstra benefício na presença e sensibilidade em sua ausência destes inibidores (SUN et al., 2014). Nosso grupo demonstrou que elevados níveis de GLI1/GLI2 pode ser uma via de resistência aos inibidores de BRAF por ativação da via de *Hedgehog*

(Hh) não-canônica envolvendo a sinalização de *Transforming growth factor beta* e *Mad-related family* (TGFβ/SMAD) (FAIÃO-FLORES et al., 2016).

É evidente que o desenvolvimento dos inibidores de BRAF e de MEK e a aprovação de terapia combinatória propiciaram uma revolução no tratamento do melanoma metastático devido às altíssimas taxas de respostas alcançadas (81%), além de resultar em aumento da sobrevida livre de progressão de 9,4 meses, quando comparado à monoterapia (dabrafenibe) com 5,8 meses (FLAHERTY et al., 2012), porém a recidiva ainda é alta, demonstrando a necessidade de combate à resistência. Desta forma, estas células duplo-resistentes são de extrema relevância para o atual e futuros estudos, no qual pretende-se compreender, em um ambiente *in vitro*, o que acontece com um paciente quando adquire-se resistência após os tratamentos combinatórios. Há poucos dados na literatura de caracterização da dupla-resistência aos inibidores de BRAF/MEK (WAGLE et al., 2014; WELSH et al., 2016; LU et al., 2017), mas os nossos resultados de caracterização estão de acordo e demonstram a importância destas linhagens geradas que foram utilizadas nos ensaios de citotoxicidade a seguir.

4-NC demonstrou citotoxicidade em todas as linhagens do estudo (SK-MEL-19, SK-MEL-28 e SK-MEL-29) parentais, resistentes e duplo-resistente (SK-MEL-28 DR) por diferentes ensaios (exclusão do azul de tripan e clonogênico) com IC_{50} em torno de 30 µM para a maioria das linhagens. Concentrações subtóxicas (10 e 20 µM) de 4-NC demonstraram potencial na inibição de formação de colônias em tratamentos subcrônicos. O 4-NC já havia sido citotóxico para um amplo painel de células de melanoma (BROHEM et al., 2009, 2012), mas esta é primeira vez que a citotoxicidade foi demonstrada em células de melanoma que foram capazes de contornar os tratamentos mais responsivos, sendo resistentes a alguns dos melhores tratamentos aprovados na prática clínica. Importante, apesar de análises de expressão gênicas demonstrarem que a atividade MAPK se mativeram inibidas em 21% dos tumores resistentes aos inibidores de BRAF, quando tratadas com outras terapias subsequentes não foram observadas respostas, mesmo quando o mecanismo de resistência destas células já havia se mostrado como responsivo (RIZOS et al., 2014). Pensando em superar a grande quantidade de mecanismos existentes quando a resistência é gerada, uma terapia combinatória com 4-NC (composto não alvo direcionado) juntamente com inibidores da via MAPK, como vemurafenibe e trametinibe pode ser benéfico para o tratamento de pacientes com

melanoma. Neste estudo o valor de IC_{50} do 4-NC foi muito próximo quando comparadas as células parentais, resistentes e duplo-resistentes, demonstrando a ação citotóxica do composto independente de seu mecanismo de resistência.

A identificação da indução de apoptose (Anexina positiva/PI negativo) nas linhagens do estudo justifica a citotoxicidade observada anteriormente para as linhagens resistentes e duplo-resistentes. A indução de morte por apoptose já foi demonstrada em linhagens parentais (mutadas em BRAF – SK-MEL-28 ou NRAS – SK-MEL-103) e morte por necrose em outra linhagem NRAS mutada (SK-MEL-147), não sendo possível identificar as causas de diferentes tipos de mortes encontradas com o tratamento com 4-NC, mas estas células apresentam diferentes sensibilidades e possíveis sobreposições entre as vias de sinalização apoptóticas e necróticas (BROHEM et al., 2009).

Na análise da invasão de células de melanoma em ensaios 2D (Camara de Boyden) e 3D (Esferóides) após tratamentos de 24 h, o tratamento combinado com 4-NC demonstrou uma excelente eficácia em células de melanoma resistentes e duplo-resistentes. Este potencial na diminuição da invasão em linhagens de melanoma parentais (SK-MEL-28, SK-MEL 103 e SK-MEL-147) já havia observado, porém em menores proporções e consideradas significantes ($p<0,05$) apenas para as linhagens com mutação em N-RAS (SK-MEL 103 e SK-MEL-147) nas concentrações de 20 e 30 μM (BROHEM et al., 2009). Talvez, a elevada taxa de invasão celular das linhagens SK-MEL-28 R e DR geradas no estudo tenha possibilitado a melhor visualização dos resultados. Interessantemente, uma inibição de aproximadamente 90% ocorreu até mesmo em concentrações subtóxicas (10 μM), enquanto o ilomastat inibiu apenas ~30% da invasão desta linhagem celular (SANDRI et al., 2016). Talvez a ação do 4-NC não seja apenas na inibição das metaloproteinases, como é o caso do ilomastat. Além disso, a possibilidade desta diminuição invasiva pode estar relacionada à alta sensibilidade apresentada para esta linhagem. No modelo tridimensional com os esferóides, embora tenha havido a necessidade de aumentar a concentração do 4-NC (30 e 50 μM) para melhor visualização dos resultados, também foi demonstrada diminuição da invasão destas linhagens de melanoma resistentes e duplo-resistentes. De acordo com nossos resultados, o trabalho de Brohem et al., (2012) já havia demonstrado diminuição de

invasividade do melanoma em modelos de pele reconstruída 3D após tratamento com 4-NC, porém apenas para linhagens parentais tratadas com 4NC.

Os processos de migração, invasão e a atividade de metaloproteinases são relevantes na biologia do melanoma, sendo atribuídos aos piores prognósticos dos pacientes. MMPs são endopeptidases contendo zinco dependentes de cálcio e proteases, que são responsáveis por alterações na matriz extracelular (MEC), tanto quanto pela clivagem da maioria dos componentes da MEC (GIALELI, THEOCHARIS & KARAMANOS, 2011). As MMPs podem regular processos celulares essenciais como proliferação, invasão, apoptosis, adesão, angiogênese tumoral, vigilância imunológica, autofagia, diferenciação e EMT (GIALELI, THEOCHARIS & KARAMANOS, 2011; BROWN & MURRAY, 2015). Tratamento com extrato bruto de *P. umbellata* ou 4-NC isolado demonstrou redução na atividade das MMP's 2 e 9 em modelos *in vitro* e *in vivo* de fotoenvelhecimento (ROPKE et al., 2006) e em experimentos *in vitro* após o tratamento com 4-NC em células de melanoma (BROHEM et al., 2009). Desta forma, o potencial in reduzir a atividade de MMPs pode ser responsável pela diminuição da invasão observada com as linhagens do estudo.

Certos quimioterápicos têm sido desenvolvidos para induzir apoptose através de disfunção mitocondrial e produção de ROS, assim ativando a ação citotóxica. No entanto, alguns destes, principalmente inibidores proteassomais, induzem morte celular por apoptose mediada por estresse do retículo endoplasmático (RE) (BAKHSHI et al, 2008; DREXLER, 2009; NAWROCKI et al., 2005; MARIA et al., 2013). O 4-NC, um inibidor proteassomal 20S, foi capaz de induzir apoptose por aumento de ROS, alterações de dano no DNA, alterações no potencial de membrana mitocondrial e aumento de p53 (BROHEM et al., 2012).

O RE apresenta-se como uma rede de cisternas no citoplasma, responsável pelos eventos pós-traducionais como o dobramento correto e glicosilação de proteínas, antes de serem exportadas para outras regiões da célula (BAUMANN & WALZ, 2001). O estresse celular interfere no estoque de cálcio no RE, que por sua vez interfere na glicosilação ou formação de pontes dissulfetos, interrompe o processamento de peptídeos e pode levar a um acúmulo de proteínas desdobradas, criando um estresse no RE e induzindo a resposta a proteína desdobrada (*unfolded protein response* – UPR). A UPR é uma tentativa da célula em facilitar a recuperação da homeostasia advinda do estresse e restabelecer o dobramento de

proteínas do RE. Já foi descrito que o aumento na liberação de proteínas desdobradas pelo proteassomo 20S, gera diminuição na síntese global de proteínas e aumento na transcrição e tradução de chaperonas e foldases para restaurar o processamento de peptídeos no RE (FRIBLEY & WANG, 2006).

Em células eucarióticas, o monitoramento do lúmen do RE e sinalização através da via canônica da UPR são mediadas por três proteínas associadas a membrana do RE: PERK (*PKR-like eukaryotic initiation fator 2α kinase*), IRE1 (*inositol requiring enzyme 1*), e ATF6 (*activating transcription factor-6*) (HOTAMISLIGIL, 2010). O acúmulo de proteínas desenoveladas e o aumento da carga proteica no RE resulta no recrutamento de via BiP/GRP78 provinda destes sensores UPR. Os sinais iniciados por estas três proteínas transmembranas são separados e se sobrepõem (HERSEY & ZANG, 2008). IREα1 é uma proteína que atua como serina/treonina quinase e endoribonuclease. Esta última atividade resulta em um forte fator de transcrição XBP1 (x box-binding protein 1), que se liga a ambos ERSE (*ER stress response element*) e UPRE (*unfolded protein response promotor elements*). A UPRE está associada com genes envolvidos com transporte de proteínas desdobradas para fora do RE e sua degradação pelo sistema ubiquitina proteassoma referido como ERAD (*ER-associated degradation*) (KANEKO et al., 2007). ATF6 compartilha muitas das atividades de IREα1 e sob estresse do RE, se transporta para o Aparelho de Golgi e é clivado por S1P/S2P serina protease para produzir um fator de transcrição que se liga aos elementos ERSE. Este processo parece estar envolvido principalmente na indução de chaperonas e preceder a produção da via ERAD mediada por IREα1 (YAMAMOTO et al., 2007). PERK é uma serina/treonina quinase que possui muitos alvos, sendo o mais importante a fosforilação de eIFα2 (*eukaryotic initiation factor α2*) que resulta em sua inativação e consequente inibição da tradução proteica com o intuito de aliviar o estresse no RE. PERK fosforilado pode traduzir o fator de transcrição ATF4, que inclui os genes alvos GADD34 e GADD153 [*CCAAT/enhancer binding protein-homologous protein (CHOP)*] (HERSEY & ZANG, 2008).

A resposta UPR é uma tentativa de aliviar o estresse ao RE, e que se não alcançado, a célula se torna funcionalmente comprometida e pode sofrer apoptose (HOTAMISLIGIL, 2010). O 4-NC é inibidor proteassomal e induziu apoptose nestas linhagens, desta forma, a investigação do mecanismo de ação desta citotoxicidade demonstrou elevados níveis de expressão proteica de BIP em todas as linhagens do

estudo, mas esta superexpressão foi mais evidente no trio SK-MEL-28 P, R e DR. A análise mais detalhada das principais vias demonstrou diferentes caminhos para indução do estresse do RE, sendo as linhagens SK-MEL-28 P e R apresentaram elevados níveis de IRE-1 total, PDI, HERPUD1 e ERO1-a, enquanto a linhagem DR demonstrou aumento de p-IRE1, mas também ativação de p-PERK e GADD34 que por sua vez controla a fosforilação de EIF2a e ATF-4 por feedback negativo. Importantemente, houve indução do estresse do RE em todas as linhagens do estudo comprovada pela superexpressão de BIP e CHOP, que são proteínas sinalizadoras importantes do início e fim, respectivamente da resposta UPR. CHOP tem papel importante na indução de apoptose durante estresse do RE prolongado (SZEGEZDI et al., 2006).

Para avaliar se a apoptose identificada nas células resistentes e duplo-resistentes é dependente de CHOP, foi realizado o silenciamento de CHOP humano (shRNA) em todas as linhagens celulares do estudo e confirmado por Western blotting. O ensaio de citotoxicidade por exclusão do azul de tripan com duas sequências que demonstraram melhor inibição da expressão de CHOP (shRNA) e o vetor vazio (PLKO) demonstrou diminuição na morte celular observada após o tratamento com 4-NC (30 µM) em uso isolado ou combinado. Embora, o resultado obtido tenha demonstrado significância, a leve diminuição observada por ter ocorrido por vários motivos. O fator de transcrição CHOP é bem conhecido por promover morte celular por apoptose, mas não é proteína exclusiva para gerar esses eventos (SZEGEZDI et al., 2006). IRE1 ativo (p-IRE1) recruta o fator 2 associado ao receptor TNF da molécula adaptadora (TRAF2) para formar o complexo IRE1-TRAF2 que pode recrutar a quinase reguladora do sinal de apoptose (ASK1) (NISHITOH et al., 1998). Essa superexpressão está relacionada à ativação da JNK, uma resposta comum ao estresse de RE conhecida por influenciar a maquinaria de morte celular através da regulação das proteínas da família BCL-2 (DAVIES, 2000). No entanto, a identificação de 4-NC como indutor de estresse ER é real, devido à superexpressão de CHOP e BiP em todas as linhagens celulares. Além disso, estudos analisando mecanismos envolvidos com apoptose induzida por CHOP mostraram muitos genes alvo a jusante incluindo BCL-2, GADD34, ERO1α e proteína 3 relacionada a Tribbles (TRB3) (SZEGEZDI et al., 2006) e duas destas proteínas (GADD34 e ERO1α) foram superexpressas quando tratadas com 4-NC neste trabalho. Curiosamente, as células de melanoma parentais e resistentes apresentaram superexpressão de ERO1α

induzida por IRE1α, enquanto as células duplo-resistentes mostraram aumento da GADD34 desencadeada por p-PERK, demonstrando a ativação de sinais apoptóticos após a expressão de CHOP. Todavia, 4-NC é um inibidor proteassomal 20S capaz de induzir superexpressão de p53 e múltiplos alvos transcricionais a jusante como família pró-apoptótica BCL-2 como Noxa, bem como a clivagem de outros pró-membros incluindo Bax e Bid (BROHEM et al., 2012), demonstrando a possível expressão também dessas outras vias para atingir os eventos apoptóticos. Desta forma, o estresse do RE pode ser parcialmente responsável pela indução de apoptose observada após os tratamentos com 4-NC.

A avaliação do potencial do 4-NC *in vivo* foi iniciada com experimentos xenográficos com a linhagem parental SK-MEL-103 (NRAS mutada) por ser a linhagem que demonstrou ótimos resultados em trabalhos anteriores *in vitro* (BROHEM et al., 2009, 2012) e representar um importante grupo de pacientes que não possuem terapias efetivas aprovadas. Embora mutações NRAS esteja presente em 15-20% dos pacientes com melanoma, tem se demonstrado ser preditor independente de baixa sobrevida e estão associados com rápida progressão tumoral e incidência aumentada de metástases cerebrais (JACOB et al., 2012; CARLINO et al., 2014). Os tratamentos para pacientes com mutação NRAS são limitados à quimioterapia agressiva mostrando resposta não duradouras e baixas taxas de resposta, enquanto os inibidores imunológicos demonstram resposta duradoura, mas com ação lenta (NIESSNER et al., 2017).

Este é o primeiro estudo demonstrando citotoxicidade do 4-NC em modelos de melanoma *in vivo*. O potencial antitumoral deste composto demonstrou inibição do crescimento de tumores xenográficos com resposta parcial em 4 de 10 animais tratados com 10 mg/kg de 4-NC (i.p.) e também remissão completa em 1 animal. O ensaio piloto com tratamento por s.c. injeção demonstrou excelente resposta em 1 de 2 animais. Importantemente, esta resposta foi alcançada em modelos com células de melanoma com mutações em NRAS, para as quais é difícil encontrar um tratamento eficaz.

Inibidor proteassomal e indutor do estresse do RE como o Bortezomibe (também conhecido como PS-341) é aprovado para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo mieloma múltiplo e linfoma celular, mas demonstrou resposta limitada a tumores sólidos sendo relacionada à penetração sub-ótima do composto (PAPANDREOU et al., 2004). O efeito citotóxico do bortezomibe foi demonstrado na

formação de colônias (*CFU – colony formation unit*) de células progenitoras de origem eritróide (*burst-forming unit-erythroid* - BFU-E) e em menor proporção, mas também em células de origem granulócito/macrófago (*CFU-granulocyte/macrophage* - CFU-GM), (SCHMIDT-HIEBER et al., 2012). Além disso, o perfil de hematotoxicidade para pacientes de mieloma múltiplo tratados com bortezomibe demonstram 40% de trompocitopenia, 21% de anemia e 19% de neutropenia (RICHARDSON et al., 2003).

Para os mais comuns indutores de estresse do RE, a Tunicamicina, um antibiótico ativo contra diferentes bactérias, fungos e vírus, demonstrou alta neurotoxicidade, lesões no fígado e rim, além de morte dos animais tratados com o composto. Este composto nunca foi utilizado em humanos por causa de sua toxicidade. Já a Tapsigargina promoveu grave irritação na pele, hipersecreção das glândulas salivares, gastroenterites, vômitos, diarreia, febre, distúrbios nervosos e morte nos casos mais graves de intoxicação (FOUFELLE & FROMENTY, 2016).

O ensaio toxicológico apresentou baixa citotoxicidade em camundongos BALB/c tratados com 4-NC por 3 vezes por semana durante 3 semanas (9 doses), o mesmo tratamento que demonstrou efeito antitumoral em modelos xenográficos. Granulócitos aumentados e progenitores hematopoiéticos diminuídos foram observados apenas na medula óssea, demonstrando que o 4-NC tem efeito na proliferação dessas células, mas não foram observadas alterações em parâmetros bioquímicos do soro. O número de granulócitos também pode ser aumentado, induzindo a taxa de proliferação de células progenitoras hematopoiéticas e sua taxa de diferenciação para granulócitos. O fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) é o fator mais importante para induzir a geração de novos granulócitos a partir da medula óssea e tem sido utilizado para tratar neutropenia induzida por quimioterapia ou radioterapia (MOORE, 1990). Os neutrófilos constituem cerca de 95% dos granulócitos e sua atividade é parcialmente regulada por sua vida útil curta sob condições normais (JIANG & SCHWARZ, 2010). Metaloproteinases como MT1-MMP (MMP14) são ectoenzimas envolvidas na clivagem de moléculas de adesão, portanto desestabilizando a adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular regulando desta forma a migração dos leucócitos (SALMI & JALKNEM, 2005). É possível que papel do 4-NC em inibir MMP tenha efeito na mobilidade destes granulócitos dificultado sua saída da medula óssea para o sangue periférico, motivo ao qual não foram vistas diferenças no hemograma.

Foi possível observar diminuição do número de linfócitos (T CD4, T CD8 e NK) e de monócitos/macrófagos, refletindo talvez uma resposta anti-inflamatória do tratamento com 4-NC *in vivo*. Cunha et al., (2013) demonstraram inibição no crescimento e diferenciação de células progenitoras granulócitos/macrofágicas de 4-NC (IC_{50} 293 µM) de maneira concentração dependente em ensaios *in vitro*, mas essa hematotoxicidade foi considerada leve quando comparada a 5-fluoruacil e ciclofosfamida. Analisando a viabilidade de linfócitos B e T na medula óssea em nossas amostras, não houve morte celular, corroborando com o fato de que o 4-NC pode estar demonstrando imunossupressão nesses animais. Um efeito anti-inflamatório *in vivo* do extrato de *P. umbellata* foi observado na inflamação induzida por carragenina, similar ao grupo tratado com indometacina, indicando ação do extrato nas últimas fases da inflamação, provavelmente envolvendo metabólitos do ácido araquidônico produzindo edema dependente da mobilização de neutrófilos (PERAZZO et al, 2005).

O papel do sistema imunológico é reagir contra as células tumorais e contra a progressão tumoral, mas a inflamação crônica também está associada a muitos tipos de câncer (pele, mama, próstata, ovário, mucosa gástrica, intestino grosso, fígado e bexiga urinária) (COUSSENS & WERB, 2001). Um dos novos *hallmarks* do câncer, as células infiltrantes do sistema imune são cada vez mais aceitas como constituintes dos tumores, trabalhando como leucócitos antagonistas ou promotores tumorais podendo ser encontrados na maioria das lesões neoplásicas (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Desta forma, uma alteração de perfil de linfócitos e macrófagos pode ocorrer e assim passarem a assumir um papel pró-tumoral, causando um ambiente anérgico e facilitador do tumor (KATZ, MULLER & PRENDERGAST, 2008). Além disso, uma variedade de progenitores mielóides parcialmente diferenciados foi encontrada em tumores (MURDOCH et al., 2008) e, juntamente com suas células imunes diferenciadas, demonstraram atividade promotora tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011). As células inflamatórias podem sintetizar várias MMPs, incluindo -9, -12 e -14, estimulando assim a progressão do câncer (EGEBLAD & WERB, 2002).

Anti-inflamatórios e analgésicos como o ácido acetilsalicílico (Aspirina) apresentaram diminuição do risco de câncer de cólon (THUN, NAMBOODIRI & HEALTH, 1991), além de diminuir a inflamação afetando o desenvolvimento do

tumor, também inibem diretamente a atividade da MMP-2 e diminuem invasão em ensaios *in vitro* (JIANG, LIAO & LEE, 2001).

Embora não tenha sido possível avaliar os níveis de citocinas inflamatórias e MMPs pela ausência de amostras suficientes, esse efeito antitumoral observado em modelos xenográficos pode ser devido ao potencial inibitório de MMP-2 e -9 após os tratamentos com 4-NC, porém futuros estudos serão necessários para confirmar esses achados.

A atividade enzimática bloqueadora das MMPs pode ser atraente para o tratamento do câncer, mas inibidores naturais como *Tissue inhibitor of metalloproteinases 2* e 4 (TIMP) podem apresentar outras atividades promotoras tumorais que são independentes de MMP quando administrados sistemicamente (JIANG et al, 2001). Inibidores de MMP não peptidomiméticos foram sintetizados a partir da conformação do sítio ativo das MMPs, como BAY 12-95566 e Prinomastate. O estudo com BAY 12-9566 (Fase I) demonstrou efeitos adversos leves (HIRTE et al., 2000), mas os resultados preliminares da Fase III em pacientes com câncer de pulmão de pequenas células avançado ou com tumores de pâncreas demonstraram baixa sobrevida para o grupo tratado quando comparado ao placebo (MOORE et al., 2003). O estudo com Prinomastate combinado com a quimioterapia padrão para o câncer de próstata avançado foi interrompido devido à ausência de efeitos benéficos em comparação com a quimioterapia isolada (PFIZER, 2018). Desta forma, encontrar um composto que possa inibir MMPs com baixa toxicidade é de suma importância. Ainda mais quando pensamos em pacientes com NRAS mutantes que praticamente não têm tratamento efetivo, a busca é mais promissora.

Estes resultados ainda são preliminares, mas foi possível observar pela diminuição dos volumes tumorais destes animais que o 4-NC é um composto com potencial *in vivo* para ser melhor investigado para o tratamento do melanoma cutâneo em pacientes. Pelos resultados *in vitro*, o 4-NC demonstrou promissora citotoxicidade por indução de apoptose gerada por inibição proteasssomal e consequente estresse do RE com indução da resposta UPR para linhagens de melanoma parentais, resistentes e duplo-resistentes. Além disso, a baixa citotoxicidade sistêmica em ensaio toxicológico identifica o 4-NC como promissor para o tratamento do melanoma cutâneo tanto para pacientes portadores de melanomas resistentes quanto naives, ou seja, nunca expostos aos potentes inibidores da MAPK, incluindo NRAS mutantes.

7. CONCLUSÕES

Foram geradas com sucesso as linhagens SK-MEL-19 DR e SK-MEL-29 DR duplo-resistentes, comprovadamente por reativação da via MAPK, enquanto a linhagem SK-MEL-28 DR apresentou resistência intrínseca ao trametinibe, por superativação de EGFR. Foi também gerada uma nova linhagem SK-MEL-28 DR a partir de linhagens parentais, caracterizada por reativação da via MAPK com superexpressão de CRAF, MEK e ERK fosforilados e confirmadas com análises de citotoxicidade (MTT), análises microscópicas e imunofluorescência. Ambos os processos geraram linhagens com superexpressão da via MAPK, porém há diferenças na expressão *upstream* da via, como exemplo, a linhagem SK-MEL-29 DR gerada a partir da linhagem resistente demontrou superexpressão de p-BRAF enquanto a linhagem SK-MEL-28 DR gerada a partir da parental demonstrou elevada expressão de p-CRAF (Ser338) como tem sido correlacionado na literatura com as terapias combinadas para células resistentes (LU et al., 2017).

O 4-NC em uso isolado ou em combinação com vemurafenibe e trametinibe demonstrou ser citotóxico em tratamentos por 24h para linhagens parentais (sensíveis), resistentes ao vemurafenibe e duplo-resistentes (vemurafenibe + trametinibe), com incremento de morte de aproximadamente 41, 35 e 44 % em média na concentração de 30 μM, respectivamente. Os tratamentos com 4-NC demonstraram ainda a inibição na formação de colônias em todas as linhagens do estudo, diminuição na invasão das linhagens SK-MEL-28 R e DR em modelos bi e tridimensional. Demonstramos a indução de apoptose nas linhagens SK-MEL-29R (62%), SK-MEL-28 R (38,6%) e SK-MEL-28 DR (53,2) e de necrose (26,1%) na SK-MEL-19R. Importante ressaltar que a expressão proteica aumentada de BIP e CHOP em todas as linhagens P, R e DR indicam a ativação da via canônica de estresse no RE (UPR) por diferentes vias, demonstrando superexpresão de t-IRE1α para as linhagens P e R e de p-IRE1α e p-PERK para a linhagem DR. Embora demonstre uma diminuição de apoptose nas células tratadas com 4-NC após o silenciamento de CHOP, os resultados não foram conclusivos de que a apoptose vista anteriormente foi dependente desta proteína.

Os ensaios tumorigênicos preliminares com modelos xenográficos em camundongos BALB/c *nude* inoculados com células de melanoma humano com mutações em NRAS demonstraram volumes tumorais reduzidos ($p<0,05$) para em 4

animais tratados com 4-NC (n=10) quando comparados aos controles DMSO (n=5) e com remissão tumoral completa de 1 animal, indicando que o 4-NC é um composto com potencial *in vivo* para ser melhor investigado para o tratamento do melanoma cutâneo. Os resultados do RT-PCR em tempo real demonstraram expressão diminuída de MMP2 e MMP14 quando comparado com o controle tratado com DMSO, demonstrando um possível papel do 4-NC na inibição de invasão em células de melanoma *in vivo*. A análise de western blotting demonstrou aumento na expressão das proteínas p53 e PARP clivado nestes tumores extraídos dos animais nos diferentes grupos experimentais, indicando possível indução de apoptose.

O ensaio xenográfico piloto por via subcutânea demonstrou eficácia em 1 animal (n= 2) também quando administrado por esta via quando comparado aos controles (n= 1). Análises da medula óssea e hemograma demonstraram diminuição de leucócitos e células progenitoras da medula óssea, mas devido ao pequeno número de animais não foi possível identifcar a significancia das diferenças.

O ensaio com inoculação de células resistentes (SK-MEL-29 R) não formou tumor xenográficos nos 3 animais utilizados e as marcações visualizadas (anti-melanoma HMB45 + MC2-7C10 + M2-9E3) no pulmão estão sendo analisadas. A análise do potencial antitumoral do 4-NC em experimentos xenográficos *in vivo* com células resistentes não foi possível e análises futuras serão necessárias.

O 4-NC praticamente não induziu alterações nos pulmões, rins, fígado e cérebro. Dos parâmetros bioquímicos do soro apenas se observou aumento de uréia e diminuição de fosfatase alcalina, não apresentando alterações das enzimas hepáticas e da creatinina quando comparados com o controle. A medula óssea demonstrou aumento de granulócitos e diminuição de eritrócitos, células tronco hematopoéticas, progenitores linfóides e outras linhagens do sistema imune (mono/macrófagos, linfócitos T CD4 e CD8 e células NK) na medula óssea demonstrando um potencial anti-inflamatório não identificado anteriormente. No hemograma, os níveis de hemoglobina e plaquetas foram levemente aumentados, mas o grupo tardio já demonstra tendência a recuperação. Todas as outras células analisadas por hemograma e mielograma não demonstraram alterações siginificantes, indicando leve citotoxicidade sistêmica do composto quando administrado por via subcutânea.

Em resumo, o 4-NC foi capaz de induzir morte celular em células resistentes e duplo-resistentes geradas com o uso de inibidores de BRAF e de MEK em

tratamentos combinatórios, por ativação do sistema UPR da via de stress de retículo endoplasmático. Demonstramos pela primeira vez a eficácia de seu uso isolado em células de melanoma parentais NRAS mutadas em experimentos *in vivo.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.; KAUFFMAN, M. Development of the Proteasome Inhibitor Velcade TM (Bortezomib). Cancer Investigations. 22: 304-311, 2004.

ADAMS, J.; PALOMBELLA, V.J., SAUSVILLE, E.A. Proteasome Inhibitors: A Novel Class of Potent and Effective Antitumor Agents. Cancer Research. 59: 2615-2622, 1999.

ALMEIDA, J.R.C.; Farmacêuticos em Oncologia – Uma nova Realidade. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

ANVISA, Anvisa aprova terapia combinada metastatico BRAF+. Disponível em: <https://www.onconews.com.br/site/noticias/noticias/ultimas/2399-anvisa-aprova-terapia-combinada-no-melanoma-metast%C3%A1tico-braf.html>. Acesso em: 01.04.2018.

ANVISA, MEDICAMENTOS NOVOS. Registrados medicamentos inovadores para câncer de pele. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?x=0&y=0&_3_keywords=melanoma&_3_formDate=1441824476958&p_p_id=3&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&_3_groupId=0&_3_struts_action=%2Fsearch%2Fsearch&_3_cur=1&_3_format>. Acesso em: 13.04.2018.

APLIN A.E., KAPLAN F.M., SHAO Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. The Soc Invest Dermatol.131: 1818-1820, 2011.

BAHLEDA R, DELEY MCL, BERNARD A, et al. Phase I trial of bortezomib daily dose: safety, pharmacokinetic profile, biological effects and early clinical evaluation in patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs. 2: 1-10, 2017.

BAKHSHI J., WEINSTEIN L., POKSAY K.S. et al., Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin. Apoptosis, 13 (7): 904-914. 2008.

BALL N.J., YOHN J.J., MORELLI J.G. et al., Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. J Invest Dermatol. 102(3): 285-90, 1994.

BARROS S.B.M., TEIXEIRA D.S., AZNAR A.E., et al. AntioxidantactivityofethanolicextractsofPhotomorpheumbellataL.Miq. Ciência e Cultura. 48: 114-116, 1996.

BASLAN T & HICKS J. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing. Nat Rev Cancer. 17(9):557-569, 2017. doi: 10.1038/nrc.2017.58.

BAUMANN O., and WALZ B. Endoplasmatic reticulum of animal cells and its organisation into structural and functional domains. Int. Rev. Cytol. 205: 149-214. 2001.

BENFICA PL, ÁVILA RI, RODRIGUES BDS, et al. 4-Nerolidylcathechol: apoptosis by mitochondrial mechanisms with reduction in cyclin D1 at G0/G1 stage of the chronic myelogenous K562 cell line. Pharm Biol. 55 (1): 1899-1908, 2017.

BROHEM CA, SAWADA TCH, MASSARO RR, et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. Toxicol in Vitro, 23: 111–119, 2009.

BROHEM, C. A., MASSARO R.R., TIAGO M. , et al. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatecol induces melanoma celldeath. Signaling& Cell Biology. 25(3): 354-369. 2012.

BROWN GT, MURRAY GI. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J Pathol 237(3):273–281, 2015. https://doi.org/10.1002/path.4586.

BROWN, J.M. & ATTARDI, L.D. The role of apoptosis in cancer development and treatetment response. Nat. Rev. Cancer 5: 231-237. 2005.

BRYDER D, ROSSI DJ, WEISSMAN IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. Am J Pathol. 169(2):338-46, 2006.

BUCHEIT AD & DAVIES MA. Emerging insights into resistance to BRAF inhibitors in melanoma. Biochem Pharmacol. 87 (3): 381-389, 2014.

CALIANESE D., CAMMARATA G., BRUM G. et al. Human melanoma cells resist oxidative stress due to overactive MEK/ERK and AKT/mTOR pathways and overproduction of melanin. [abstract]. In: Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Reseach; 210 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR: Cancer Research 73: (8 Suppl): Abstract n. 5247. 2013. doi: 10.1158/1538-7445.AM2013-5247.

CARLINO M.S. et al. Antiproliferative effects of continued mitogen-activated protein kinase pathway inhbition following acquired resistance to BRAF and/or MEK inhbition in melanoma. Mol. Cancer Ther. 12: 1332-1342, 2013.

CARLINO MS, HAYDU LE, KAKAVAND H et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. Br J Cancer. 111(2): 292-299, 2014. Doi 10.1038/bjc.2014.287.

CARMELIET, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257. 2000.

CHAPMAN, P,B, HAUSCHILD, A., ROBERT, C, et al. BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. N. Engl. J. Med. 364 (26): 2507-2516. 2011.

CHEN K.G., VALENCIA J.C., GILLET J.P., et al. Involvement of ABC transporters in melanogenisis and the development of multidrug resistance of melanoma. Pigment Cell Melanoma Res 22: 740-749. 2009.

CHEN Y-T, STOCKERT E, JUNGBLUTH A, et al. Serological analysis of Melan-A (MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 5915-5919, 1996.

CHO, S. G. & CHOI, E. J. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. J. Biochem. Mol.Biol. **35**, 24-27. 2002.

CHU W., PAK B. J., BANI M.R. et al. Tyrosinase-related protein 2 as a mediator of melanoma specific resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II): therapeutic implications. Oncogene 19: 395-402. 2000.

CLARK W.H., ELDER D.E., GUERRY D. et al., A study of Tumor Progression: The Precursor Lesions of Superficial Spreading and Nodular Melanoma. Human Pathology vol. 15, n. 2: 1147-1165, 1984.

CORTEZ AP, ÁVILA RI, CUNHA CRM, et al., 4-Nerolidylcathecol analogues as promising anticâncer agents. European Journal of Pharmacology. 765: 517-524, 2015.

COUSSENS, L. M. & WERB, Z. Inflammatory cells and cancer: think different! J. Exp. Med. 193: F23–F26, 2001.

CRAWFORD LJ, WALKER B, IRVINE AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. J Cell Commun Signal. 5: 101-110, 2011.

CUNHA CRM, NETO SAM, SILVA CC, et al. 4-Nerolidylcathecol and its synthetic analogues: Antioxidant activity and toxicity evaluation. European Journal of Pharmacology. 62: 371-378, 2013.

CURTIN J.A., FRIDLYAND J., KAGESHITA T., et al. Distinct of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med. 353(20): 2135-47, 2005.

DAVIES RJ. Signal transduction by JNK group of MAP kinases. Cell. 103: 239-252, 2000.

DAVIES H., BIGNELL G.R., COX C. et al., Mutations of the BRAF gene in human câncer. Nature. 417(6892): 949-954, 2002.

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

DESMARCHELIER C, BARROS S, REPETTO M, et al. 4-Nerolidylcatechol from Pothomorphe Spp. Scavenges Peroxyl Radicals and Inhibits Fe(ll)-Dependent DNA Damage. Planta Med, 63,1997.

DIPIRO, J.T.; TALBERT, R.L.; YEE, G.C. *et al*; Pharmacoterapy – A Pathophysiological Approach. 6.ed. The McGraw-Hill, 2005.

DONG L.F., SWETTENHAM E., ELIASSON J., et al. Vitamin E analogues inhibit angiogenesis by selective induction of apoptosis in proliferating endothelial cells: the role of oxidative stress. Cancer Res. 67(24): 11906-11913, 2007.

DREXLER H.C. Synergistic apoptosis induction in leukemic cells by the phosphatase inhibitor salubrinal and proteasome inhibitors. Plos One, 4 (1): e4161.2009.

EGEBLAD M & WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature Review Cancer, 2002. 2: 161-174.

FAIÃO-FLORES F., ALVES-FERNANDES D.K., PENNACCHI P.C. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. Oncogene. 1-13. 2016. Disponível em: http://www.nature.com/onc/journal/vaop/ncurrent/full/onc2016348a.html.

FAN HX, WANG S, ZHAO H. et al. Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis os oral squamous cell carcinoma by activanting MMP-9 and E-caderin expression. Med Oncol. 41: 31- 41, 2014.

FAN YH, DING J, NGUYEN S. et al. Aberrant hedgehog signaling is responsible for the highly invasive behavior of a subpopulation of hepatoma cells. Oncogene. 35: 116-124, 2016.

FDA, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Approved Drugs – Trametinib/Dabrafenib. Disponível em. http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm476837.htm. Acesso em. 12.12.2015

FDA, U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Approved Drugs – Nivolumab. Disponível em: http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm436566.htm. Acesso em: 13/01/2016.

FEDORENKO I.V., PARAISO K.H.T., SMALLEY K.S.M. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAFV600E mutant melanoma. Biochemical Pharmacology 82: 201-209, 2011.

FEDORENKO I.V., GIBNEY G.T., SMALLEY K.S.M. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. Oncogene. 32: 3009-3018, 2013.

FERNÁNDEZ Y., VERHAEGEN M., MILLER T.P., et al. Differential Regulation of Noxa in Normal Melanocytes and Melanoma Cells by Proteasome Inhibition: Therapeutic Implications. Cancer Res; 65(14): 6294-304, 2005.

FLAHERTY K.T., HODI F.S., FISHER D.E. From genes to drugs: target strategies fro melanoma. Nature Reviews Cancer.12:349-361. 2012.

FLAHERTY K.T., PUZZANOV I., KIM FDAK.B. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. New Eng. J. Med. 363: 809-19, 2010.

FLAHERTY K.T., ROBERT C., HERSEY P. et al. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. The New Engl. J. Med. 367(2): 107-114, 2012.

FLAHERTY KT, INFANTE JR, DAUD A, et al. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. N Engl J Med. 367 (18): 1694-1703, 2012b.

FOUFELLE F & FROMENTY B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. Pharmacology Research & Perspectives. 4 (1): 1-28, e00211, 2016.

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. Danvers: Wiley-Liss, 5th Ed. p. 348-349. 2005.

FRIBLEY, A. & WANG, C. Proteasome Inhibitor Induces Apoptosis through Induction of Endoplasmic Reticulum Stress. Cancer Biology & Therapy: 5: 7, 745-748, 2006.

GIALELI C, THEOCHARIS AD, KARAMANOS NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. FEBS J 278(1):16–27, 2011. https://doi. org/10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x.

GIBNEY G.T., MESSINA J.L., FEDORENKO I.V. et al. Paradoxical oncogenesis – the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma. Nature Reviews Clinical Oncology.10: 390-399. 2013.

GIROTTI M.R., PEDERSEN M., SANCHEZ-LAORDEN B., et al. Inhibiting EGF Receptor or SRC Family Kinase SIgnaling Overcomes BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. Cancer Discovery 3(2): 158-167. 2013.

GOETZ E.M., GHANDI M., TREACY D.J. et al. ERK mutations confer resistance to mitogen-activated protein kinase pathway inhibitors. Cancer Research, 74: 7079-7089, 2014.

HANAHAN D & WEINBERG RS. Hallmarks of Cancer: The next generation. Cell 144: 646-674, 2011.

HAMMERLINDL H & SCHAIDER H. Tumor cell-intrisic phenotypic plasticity facilitates adaptative cellular reprogramming driving acquired drug resistance. J cell Commun Signal. 12 (1): 133-141, 2018.

HAQ R., SHOAG J., ANDREU-PEREZ P. et al. Oncogenic BRAF Regulates Oxidative Metabolism via PGC1α and MITF. Cancer Cell 23: 302-315. 2013.

HERSEY P. and ZHANG D. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. 21: 358-367. 2008.

HIRATA, N., NARUTO, S., OHGUCHI, K., et al. Mechanism of the melanogenesis stimulation activity of (-)-cubebin in murine B16 melanoma cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry 15, 4897–4902. 2007.

HIRTE H, GOEL R, MAJOR P et al. A phase I dose escalation study of the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 administered orally in patients with advanced solid tumors. Ann. Oncol. 11: 1579–1584, 2000.

HOLOHAN C, SCHAEYBROECK SV, LONGLEY DB, et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer* volume,13: 714–726. 2013.

HOTAMISLIGIL G.S. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. Cell. 140: 900-917. 2010.

HSIAO JJ & FISHER DE. The roles of Microphthalmia Transcription Factor and pigmentation in melanoma. Arch Biochem Biophys. 563 (1): 28-34. 2014.

IBRAHIM, N; HALUSKA, F.G. Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytec Neoplasm. Annual Review Pathologic Mechanism Disease, vol. 4, p551-579, 2009.

INCA (Instituto Nancional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). Tipos de Câncer. Pele Melanoma. Disponível em: www2.inca.gov.br. Acesso em: 08.04.2018.

JAKOB J.A, BASSET RL Jr, NG CS et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. Cancer. 118(16):4014-23, 2012. doi: 10.1002/cncr.26724.

JESENBERGER V., JENTSCH S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3(2): 112-121, 2002.

JIANG D. and SCHWARZ H. Regulation of Granulocyte and Macrophage Populations of Murine Bone Marrow Cells by G-CSF and CD137 Protein. PLoS One. 2010, 5(12): e15565. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001479/pdf/pone.0015565.pdf >. Acesso em: 30.03.2018.

JIANG, M. C., LIAO, C. F. & LEE, P. H. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits in vitro invasion of tumor cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 282, 671–677, 2001.

JIANG, Y. Wang M, Celiker MY, et al. Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. Cancer Res. 61, 2365–2370, 2001.

JOHANNESSEN C.M., BOEHM J.S., KIM S.Y. et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP Kinase pathway reactivation. Nature 468: 968-972. 2010.

JOHNSON D.B., FLAHERTY K.T., WEBER J.S., et al. Combined BRAF (Dabrafenib0 and MEK Inhibition (Trametinib) in Patients With BRAF V600- Mutant Melanoma Experiencing Progression With Single-Agent BRAF Inhibitor. Journal of Clinical Oncology vol. 32, n. 33: 3697-3704, 2014.

KANEKO M., YASUI S., NIINUMA Y., et al. A different pathway in the endoplasmic reticulum stress-induced expression of human HD=RD1 and SEL1 genes. FEBS Lett. 581: 5355-5360. 2007.

KATZ JB, MULLER AJ & PRENDERGAST GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. Immunological Reviews. 222: 206-221, 2008.

KAUR A, WEBSTER MR, MARCHBANK K, et al. sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. Nature. 532: 250-254, 2016.

KIM K.B., KEFFORD R., PAVLICKA.C., et al. Phase II Study of the MEK1/MEK2 Inhibitor Trametinib in Patients With Metastatic BRAF-Mutant Cutaneous Melanoma Previously Treated With or Without a BRAF Inhibitor. J ClinOncol. 31(4): 482-489, 2013.

KONIECZKOWSKI DJ, JOHANNESSEN CM, ABUDAYYEH O. et al. A melanoma cell state distinction influences sensitivity to MAPK pathway inhibitors. Cancer Discovery. 4 (7): 816-827, 2014.

KUDCHADKAR, R. R., PARAISO, K. H. T., SMALLEY, K.S.M. Targeting Mutant BRAF in Melanoma: Current Status and Future Development of Combination Therapy Strategies. Cancer Journa, vol.18, p.124-131, 2012.

KUDCHADKAR, R.R., SMALLEY, K.S.M., GLASS, L.F., et al. Target therapy in melanoma. Clinics in Dermatology, vol.31, p.200-208, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; et al. ROBBINS – Patologia Básica. 8.ed. Elsevier, 2008.

KURATA T, TAMURA K, KANEDA H. Effect of re-treatment with gefitinib ('Iressa', ZD1839) after acquisition of resistance. Ann Oncol. 15(1):173-4, 2004.

LARKIN J, ASCIERTO PA, DRENO B. et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF*-Mutated Melanoma. N Engl J Med. 371:1867-1876, 2014. DOI: 10.1056/NEJMoa1408868.

LIANG C., PARK A.Y. & GUAN J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nature Protocols, vol. 2, n. 2: 329-333, 2007.

LIU, F., FU, Y., MEYSKENS, F.L.JR. MITF regulates cellular response to reactive oxygen species through transcriptional regulation of APE-1/Ref-1. J Invest Dermatol 129(2), 422-31, 2009.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods Dec;25 (4):402-8. 2001.

LONG G.V., STROYAKOVSKIY D., GOGAS H., et al. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. The New England Journal of Medicine 371 (20): 1877-1887, 2014.

LU H., LIU S., ZHANG G. et al., PAK signaling drives acquired drug resistance to MAPK inhibitors in BRAF-mutant melanomas. Nature, 550:133-136, 2017.

LUKE J.J. & HODI F.S. Ipilimumab, Vemurafenib, Dabrafenib, and Trametinib: Synergistic Competitors in the Clinical Management of BRAF Mutant Malignat Melanoma. The Oncologist 18: 717-725, 2013.

MALDONADO J.L., FRIDLYAND J., PATEL H. et al., Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. J Natl Cancer Inst. 95(24):1878-90, 2003.

MANSOUR AM, DREVS J, ESSER N, et al. A New Approach for the Treatment of Malignant Melanoma: Enhanced Antitumor Efficacy of an Albumin-binding Doxorubicin Prodrug That Is Cleaved by Matrix Metalloproteinase. Cancer Res. 63: 4062–4066; 2003.

MARIA D.A., SOUZA J.G., MORAIS K.L.P. et al. A novel proteasome inhibitor acting in mitochondrial dysfunction, ER stress and ROS production. Invest New Drugs, 31: 493-505. 2013.

MARUSYK A, ALMEDRO V, POLYAK K. Intra-tumor heterogeneity: a looking glass for cancer? Nature Reviews Cancer. 12: 323-334, 2012

MASSARO RR, BROHEM CA, ALMEIDA RL, et al. 4-Nerolidylcathecol induces autophagy in human glioblastoma cells. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 53 (3): 1-10, 2017.

MENON RD, DAS S, KREPLER C, et al. A stress-induced early innate response causes multidrug tolerance in melanoma. Oncogene. 34:4448-59, 2015. doi: 10.1038/onc.2014.372.

MENZIES, A.M., LONG, G.V. Recent advances in melanoma systemic therapy. BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond.European Journal of Cancer, vol. 13, 2013.

MERLINO G, HERLYN M, FISHER DE, et al., The state of melanoma: challenges and opportunities. Pigment Cell Melanoma Res. 29 (4): 404-416, 2016.

MOORE M J, HAMM J, DNACEY J. et al. Comparison of gemcitabine versus the matrix metalloproteinase inhibitor BAY 12-9566 in patients with advanced or metastatic adenocarcinoma of the pancreas: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. J Clin Oncol. 21(17):3296-302, 2003.

MOORE MA. Hematopoietic growth factors in cancer. Cancer. 65:836–844, 1990.

MULLER J, KRIJGSMAN O. TSOI J. et al. Low MITF:AXL ratio predicts early resistance to multiple target drugs in melanoma. Nat Commun. 5: 1-15, 2014.

MURDOCH C., MUTHANA M., COFFELT S.B., et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumor angiogenesis. Nat Review. Cancer. 618-631, 2008.

NAWROCKI S.T., CAREW J.S., PINO M.S. et al. Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmatic reticulum stress-mediated apoptosis. Cancer Research 65 (24): 11658-11666. 2005.

NAZARIAN R, SHI H, WANG Q, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS. Nature. 468 (7326): 973-977, 2010.

NCI, NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer Drug Information – FDA Approval for Trametinib. Disponível em: http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-trametinib/print. Acesso em: 10.10. 2013.

NIEHR F., EUW E.V., ATTAR N., et al. Combination therapy with Vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metforminin melanoma cell lines with distinct driver mutations. Journal of Translational Medicine 9:76. 2011.

NIESSNER H., SINNBERG T., KOSNOPFEL C., et al. BRAF inhibitors amplify the pro-apoptotic activity of MEK inhibitors by inducing ER stress in NRAS-mutant melanoma. Clin Cancer Res. 23(20):6203-6214, 2017. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0098.

NIH. U.S. National Library of Medicine. Clinical Trials. Bortezomibe. Disponível em: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=melanoma&term=bortezomib&cntry=&state=&city=&dist=. Acesso em 13.04.2018.

NIH. U.S. National Library of Medicine. Clinical Trials. Target therapy melanoma. Disponível em: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=melanoma&term=target+therapy&cntry=&state=&city=&dist=. Acesso em: 13.04.2018.

NIKIFOROV M.A., RIBLETT M., TANG W.H., et al. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. Proc. Natl Acad Sci U S A. 104 (49): 19488-19493, 2007.

NISHITOH H, SAITOH M, MOCHIDA Y, et al. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. Mol Cell. 2:389-395, 1998.

O'CONNOR P.M., JACKMAN J., BAE I., et al. Characterization of the p53 Tumor Supressor Pathway in Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and Correlations with the Growth-Inhibitory Potency of 123 Anticancer Agents. Cancer Research 57: 4285-4300. 1997.

OBENAUF A.C., ZOU Y., JI A.L. et al. Therapy-induced tumor secretomes promote resistance and tumor progression. Nature 520: 368-372. 2015.

OECD protocol n. 452 descrito pela *Organization for Economic Co-operation and Development.* (OECD – Chronic Toxicity Studies, 2009). Disponível em: < http://www.oecd.org/env/test-no-452-chronic-toxicity-studies-9789264071209-en.htm>. Acesso em: 14.04.2018.

OECD protocolo nº425 descrito pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD/OCDE - Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure, 2006). Disponível em: < https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure_9789264071049-en>. Acesso em: 14.04.2018.

ONCONEWS. Disponível em: <https://www.onconews.com.br/site/noticias/noticias/ultimas/2399-anvisa-aprova-terapia-combinada-no-melanoma-metast%C3%A1tico-braf.html>. Acesso em 13.04.2018.

PADKE M.S., SINI P., and SMALLEY K.S.M. The novel ATP-Competitive MEK/Aurora Kinase Inhibitor BI-847325 Overcomes Acquired BRAF inhibitor Resistance through Suppression of Mcl-1 and MEK Expression. Mol. Cancer Ther. 14 (6): 1354-1364. 2015.

PAPANDREOU CN, DALIANI DD, NIX D, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations

in androgenindependent prostate cancer. J Clin Oncol. 22(11):2108–2121, 2004.

PARAISO K.H.T, SMALLEY K.S.M. Fibroblast-mediated drug resistance in cancer. Biochemical Pharmacology. 85:1033-1041, 2013.

PARAISO K.H.T., FEDORENKO I.V., CANTINI L.P., et al. Recoveryofphosphor-ERK activityallows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. British Journal of Cancer.102: 1724-1730, 2010.

PAULITSCHKE V., BERGER W., PAULITSCHKE P. et al. Vemurafenib resistance signature by proteome analysis offers new strategies and rational therapeutic concepts. 14 (3): 757-768, 2015. Doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0701.

PEARCE DJ, RIDLER CM, SIMPSON C et al. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. Blood. 103(7):2541-6, 2004.

PERAZZO FF., SOUZA GHB., LOPES W. et al. Antiínflammatory and analgesic properties of water-ethanolic extract from Pothomorphe umbellate (Piperaceae) aerial parts. Journal of Ethnopharmacology. 99: 215-220, 2005.

PFIZER. Clinical trial. Chemotherapy in treating patients who have metastatic prostate cancer. Available on line: https://www.pfizer.com/science/find-a-trial/NCT00003343. Access in 29, March, 2018.

PINON A., LIMAMI Y., MICALLEF L., et al. A novel formo f melanoma apoptosis resistance: Melanogenisis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delay ursolic acid-triggered Dell death. Experimental Cell Research 317(12): 1669-1676. 2011.

POKLEPOVIC A, YOUSEFFIAN L, WINNING M, et al. Phase I trial fo bortezomib and dacarbazine in melanoma and soft tissue sarcoma. Invest New Drugs. 31 (4): 937-942. 2013.

PUCK T.T. & MARCUS P.I. Action of x-rays on mammalian cells. J. Exp Med 103, 5: 653-666, 1956.

RADU M., SEMENOVA G., KOSOFF R, et al. PAK signaling during the development and progression of câncer. Nat. Rev. Cancer. 2014, 14:13-25.

REZENDE KR. Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* (L) Miq. Administrado a ratos Sprague Dawley. Tese de doutorado. 74f, 2002.

REZZE, G.G., LEON, A., DUPRAT, J. Nevo displásico (nevo atípico). Anais Brasileiros de Dermatologia, vol. 85, p.863-871, 2010.

RICHARDSON P.G., BARLOGIE B., BEREBSON J., et al., A phase 2 study of bortezomibe in relapsed, refractory myeloma. N. Engl J. Med. 348: 2609-17, 2003.

RIZOS H, MENZIES AM, PUPO GM. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: spectrum and clinical impact. Clin Cancer Res. 20 (7): 1965-1977, 2014.

ROBERT C., LONG G.V., BRADY B. et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. The New England journal of medicine. 372 (4): 320-330, 2015.

ROBERTS P.J., DER C.J. Targeting teh RAF-MEK-ERK mitogen-activsted protein kinase cascade for the treatment of cancer. Oncogene 26: 3291-3310, 2007.

ROPKE CD, DA SILVA, KERA CZ, et al. In vitro and in vivo inhibition of skin matrix metalloproteinases by pothomorpheumbellata root extract. Photochem Photobiol, 82: 439–442; 2006.

RYAN M.B., DER C.J., WANG-GILLAM A., et al., Trgeting RAS-mutant Cancers: Is ERK the key? Trends in Cancer vol. 1, 3: 183-198, 2015.

SAHA, B., SINGH, S.K., SARKAR, C., et al. Activation of the Mitf promoter by lipid-stimulated activation of p38-stress signalling to CREB. Pigment Cell & Melanoma Research 19, 595–605. 2006.

SALMI M. & JALKANEM S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. Nat Rev Immunol. 5: 760-771, 2005.

SAMATAR A.A. & POULIKAKOS P.I. Targeting RAS-ERK signaling in cancer: promises and challenges. Nature Reviews/Drug Discovery, vol. 13: 928-942, 2014.

SANDRI S., FAIÃO-FLORES F., TIAGO M. et al., Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. Pharmacological Research. 111: 523-533. 2016.

SANG-OH Y., SOO-JIN P., CHANG-HYUN Y., et al. Roles of Matrix Metalloproteinases in Tumor Metastasis and Angiogenesis Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 36 (1):128-137, 2003.

SANTOS EW, OLIVIERA DC, HASTREITER A., et al. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. Braz J Vet Anim Sci. 53 (2): 138-145, 2016.

SCHMIDT-HIEBER M, DABROWSKI R, WEIMANN A, et al. In vitro cytotoxicity of the novel antimelanoma agents periforisine, bortezomib and lenalidomide against different cell lines. Investigational New Drugs. 30 (2): 480-489, 2012.

SEGHERS AC, WILGENHOF S, LEBBÉ C et al. Successful rechallenge in two patients with BRAF-V600-mutant melanoma who experienced previous progression during treatment with a selective BRAF inhibitor. Melanoma Res. 22(6):466-72, 2012. Doi: 10.1097/CMR.0b013e3283541541.

SHAIN AH & BASTIAN BC. From melanocytes to melanomas. Nature Reviews – Cancer. 16: 345-358, 2016.

SHARMA SV, LEE DYB. A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. Cell. 141 (1): 18-20, 2010.

SHI H., HUGO W., KONG X., et al., Acquired Resistance and Clonal Evolution in Melanoma during BRAF Inhibitor Therapy. Cancer Discovery 4: 80-93, 2014.

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin. 68 (1): 7-30. 2018.

SILVA RAD. Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional. 249, 1926.

SLIPICEVIC A., HERLYN M. Narrowing the knowledge gaps fro melanoma. Upsala J. Med. Scien. 117:237-243, 2012.

SMALLEY K.S.M., FLAHERTY K.T. Integrating BRAF/MEK inhibitors into combination therapy for melanoma. British J of Cancer.100: 431-435, 2009.

SMALLEY K.S.M., HAASS N.K., BRAFFORD P.A., et al. Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. Mol. Cancer Ther 5(5): 1136-1144, 2006.

SMALLEY, K., EISEN, T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. FEBS Letters 476, 198–202. 2000.

SMALLEY, K.S.M., CONTRACTOR, R., HAASS, N.K., et al. Ki67 expression levels are a better marker of reduced melanoma growth following MEK inhibitor treatment than phosphor-ERK levels. British Journal of Cancer, vol.96, p.445-449, 2007.

SOLIT, D.B., GARRAWAY, L.A., PRATILA, C.A., et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. Nature, vol.439, p.358-362, 2006.

SOLIT, D.B., ROSEN, N. Resistance to BRAF Inhibition in Melanomas. The New England Journal of Medicine, vol. 364, p.772-774, 2011.

SOROLLA A., YERAMIAN A., DOLCET X., et al. Effect of proteassome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. Br J. DErmatol. 158(3): 496-504, 2008.

SOSMAN JA, KIM KB, SCHUCHTER L, et al. Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. N Engl J Med. 366:707-714, 2012.

SPANGRUDE GJ, HEIMFELD S, WEISSMAN IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science. 241(4861):58-62, 1988.

SUN C., WANG L., HUANG S., et al. Reversible and adaptative resistance to BRAF (V600E) inhibition in melanoma. Nature 508: 118-122. 2014.

SZEGEZDI E, LOGUE SE, GORMAN AM, et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. 7: 880-885, 2006.

TAGOUG I., JORDHEIN L.P., HERVEAU S. et al., Therapeutic Enhancement of ER Stress by Insulin-Like Growth factor I Sensitives Myeloma Cells to Proteassomal Inhibitors. Clin Cancer Res. 19(13): 1-11, 2013.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. Cell. 161: 1681-1696. 2015.

THUN, M. J., NAMBOODIRI, M. M. & HEATH, C. W. Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. N. Engl. J. Med. 325, 1593–1596, 1991.

UCHIDA N, WEISSMAN IL. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy- 1.1 bone marrow. The Journal of experimental medicine. 175(1):175-84, 1992.

VAN 'T VEER L.J., BURGERING B.M., VERSTEEG R. et al. N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. Mol Cell Biol. 9(7):3114-6, 1989.

WAGLE N., ALLEN E.M.V., TREACY D.J. et al. MAP Kinase Pathway Alterations in BRAF-Mutant Melanoma Patients with Acquired Resistance to Combined RAF/MEK Inhibition. Cancer Discovery 4(1): 61-8. 2014.

WAGLE N., EMERY C., BERGER M.F. et al. Dissecting Therapeutic Resistance to RAF Inhibition in Melanoma by Tumor Genomic Profiling. Journal of Clinical Oncology 29 (22): 3085-3096. 2011.

WANG C, THUDIUM KB, HAN M, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. Cancer Immunol Res 2:846-56, 2014.

WEBER J.S., FLAHERTY K.T., INFANTE J.R., et al. Update safety and efficacy results from a phase I/II study of the oral BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436) combined with the oral MEK 1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with BRAF-naive metastatic melanoma. J. Clin. Oncol. 30: 542. 2012.

WEISSMAN IL, SHIZURU JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. Blood. 112(9):3543-53, 2008.

WEISSMAN IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell. 100(1):157-68, 2000.

WELSH SJ, RIZOS H, SCOLYER RA, et al. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? European Journal of Cancer. 62: 76-85, 2016.

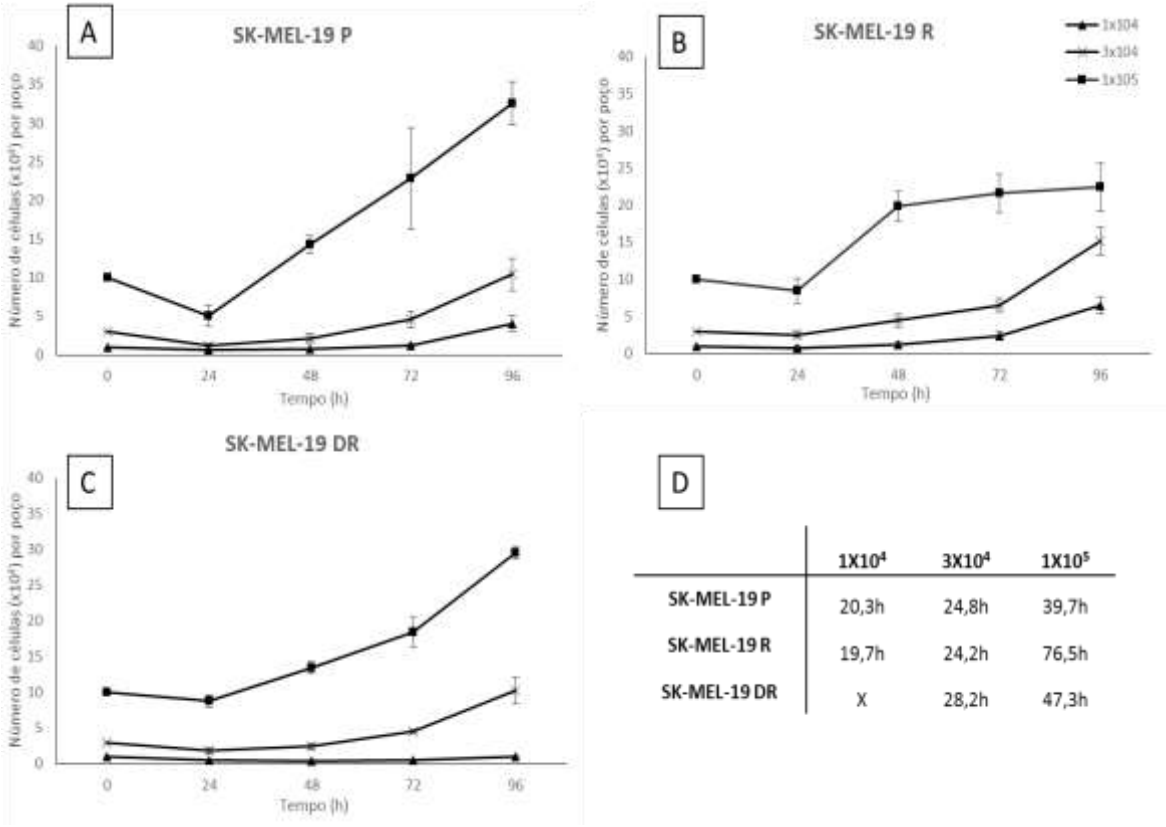
YAGIMA I., KUMASAKA M.Y., THANG N.D., et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma progression and therapy. Dermat Res and Prat 1-5, 2012.

YAMAMOTO K., SATO T., MATSUI T. et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. Dev. Cell 13: 365-376. 2007.

ZALAUDEK I, SCHMID K, MARGHOOB AA. et al. Frequency of dermoscopic nevus subtypes by age and body site: a cross-sectional study. Arch Dermatol. 2011, 147: 663-670.

APÊNDICE

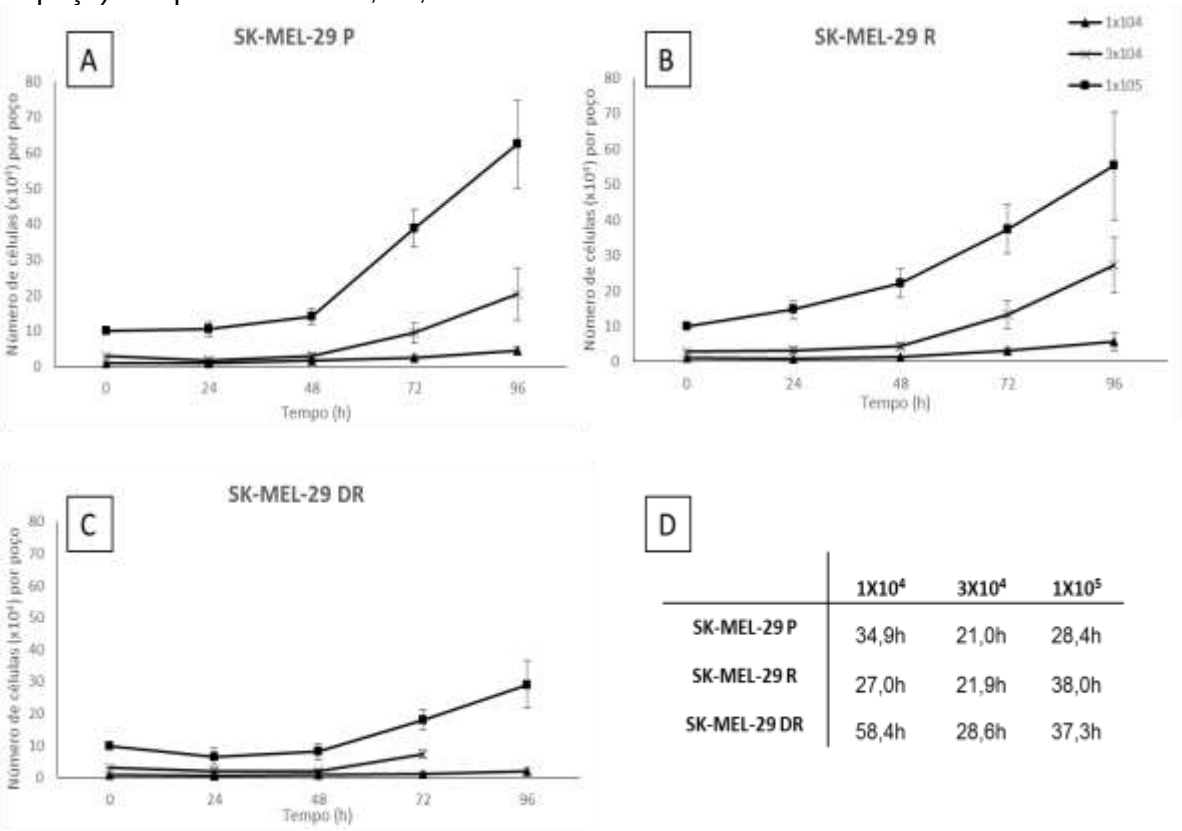
APÊNDICE A1. Curva de crescimento das linhagens SK-MEL-19 P (A), SK-MEL-19 R (B) e SK-MEL-19 DR (C) em três confluências diferentes ($1x10^4$, $3x10^4$ e $1x10^5$ células por poço) nos períodos de 24, 48, 72 e 96h



	$1X10^4$	$3X10^4$	$1X10^5$
SK-MEL-19 P	20,3h	24,8h	39,7h
SK-MEL-19 R	19,7h	24,2h	76,5h
SK-MEL-19 DR	X	28,2h	47,3h

O tempo (h) de contagem foi apresentado no eixo x e o número de células obtidas separadamente (células vivas e mortas) no eixo y. (D) Tempos de dobramento celular (*doubling time*) para cada linhagem nas diferentes confluências utilizadas no ensaio. Não foi possível o cálculo do tempo de dobramento para a linhagem SK-MEL-19 DR com a confluência de $1x10^4$ células/poço/mL.

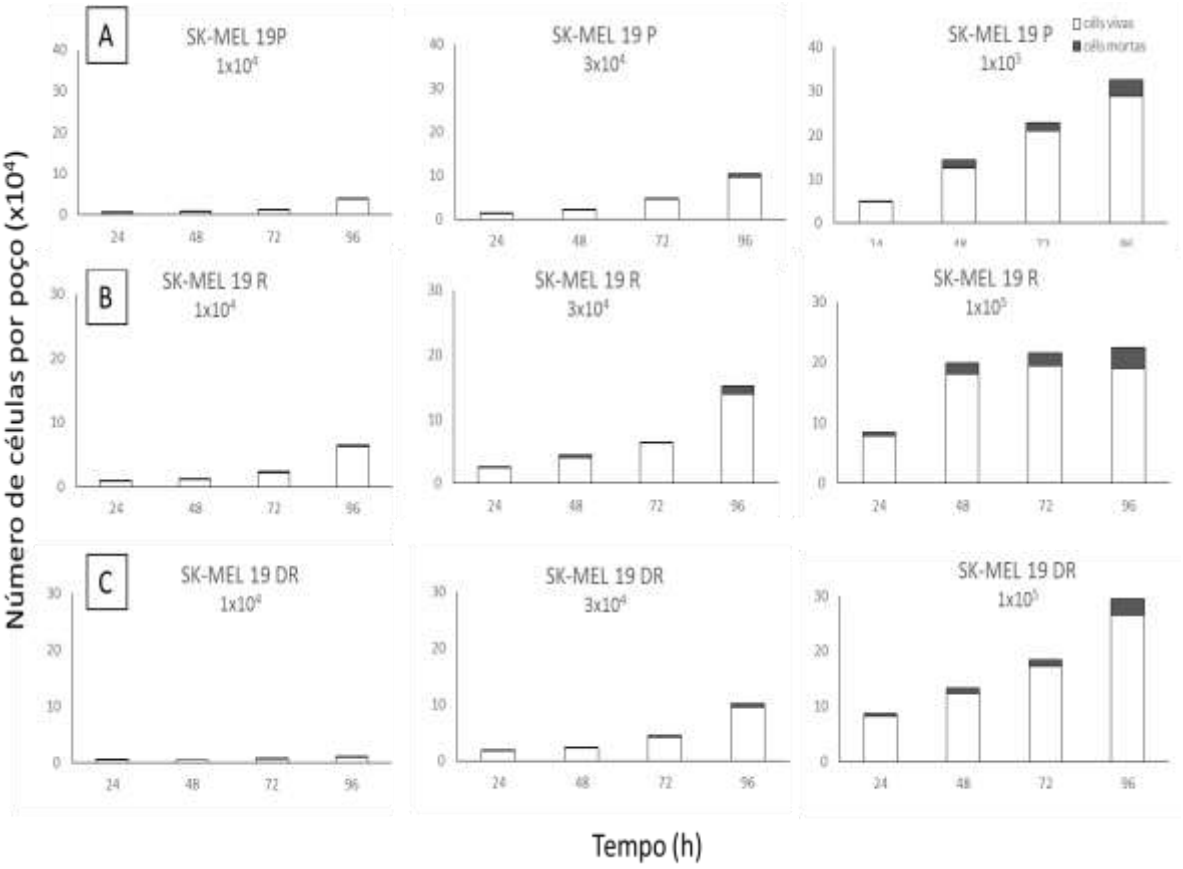
APÊNDICE A2. Curva de crescimento das linhagens SK-MEL-29 P (A), SK-MEL-29 R (B) e SK-MEL-29 DR (C) em três confluências diferentes ($1x10^4$, $3x10^4$ e $1x10^5$ células por poço) nos períodos de 24, 48, 72 e 96h



	$1X10^4$	$3X10^4$	$1X10^5$
SK-MEL-29 P	34,9h	21,0h	28,4h
SK-MEL-29 R	27,0h	21,9h	38,0h
SK-MEL-29 DR	58,4h	28,6h	37,3h

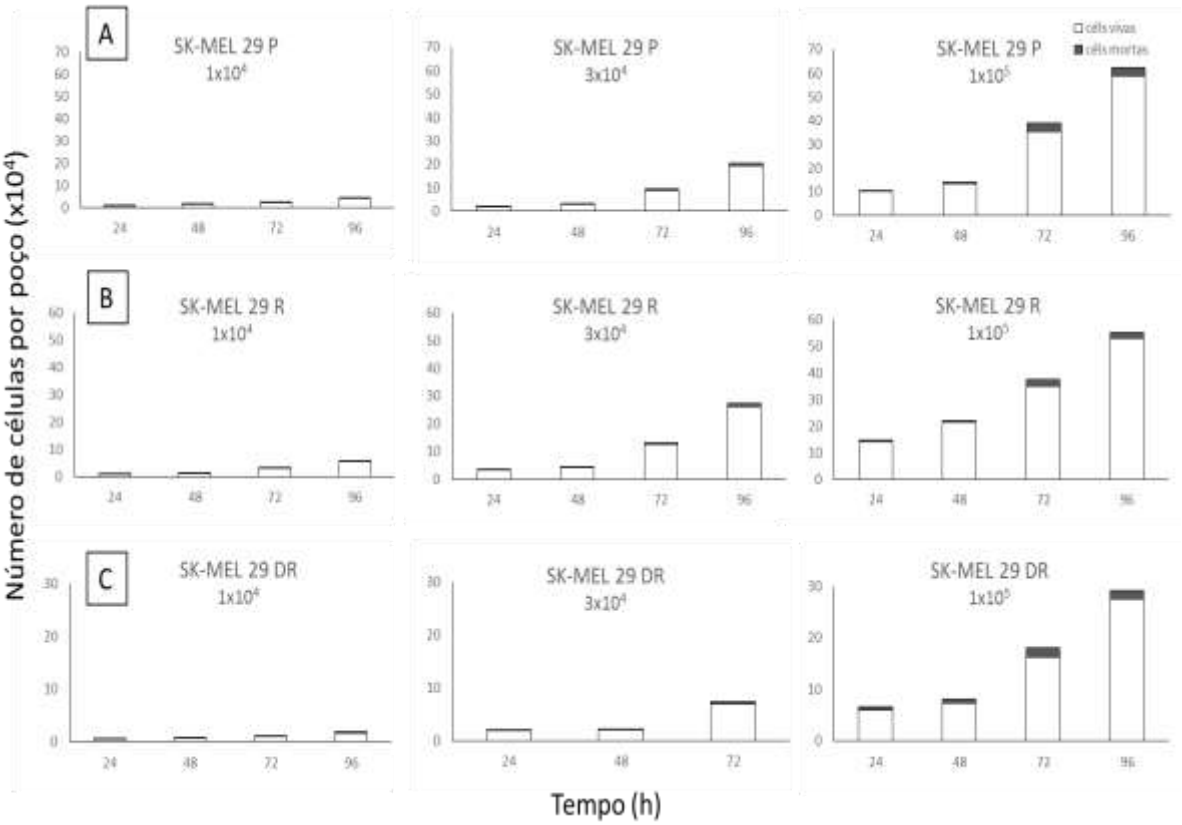
O tempo (h) de contagem foi apresentado no eixo x e o número de células obtidas (células vivas e mortas) no eixo y. (D) Tempos de dobramento celular (*doubling time*) para cada linhagem nas diferentes confluências utilizadas no ensaio. Não foi possível realizar o experimento na confluência de $3x10^4$ no período de 96h.

APÊNDICE A3. Viabilidade das linhagens SK-MEL-19 P (A), SK-MEL-19 R (B) e SK-MEL-19 DR (C) com o ensaio de exclusão do azul de tripan em três confluências diferentes ($1x10^4$, $3x10^4$ e $1x10^5$ células por poço) nos períodos de 24, 48, 72 e 96h



O tempo (h) de contagem foi apresentado no eixo x e o número de células obtidas separadamente (células vivas e mortas) no eixo y.

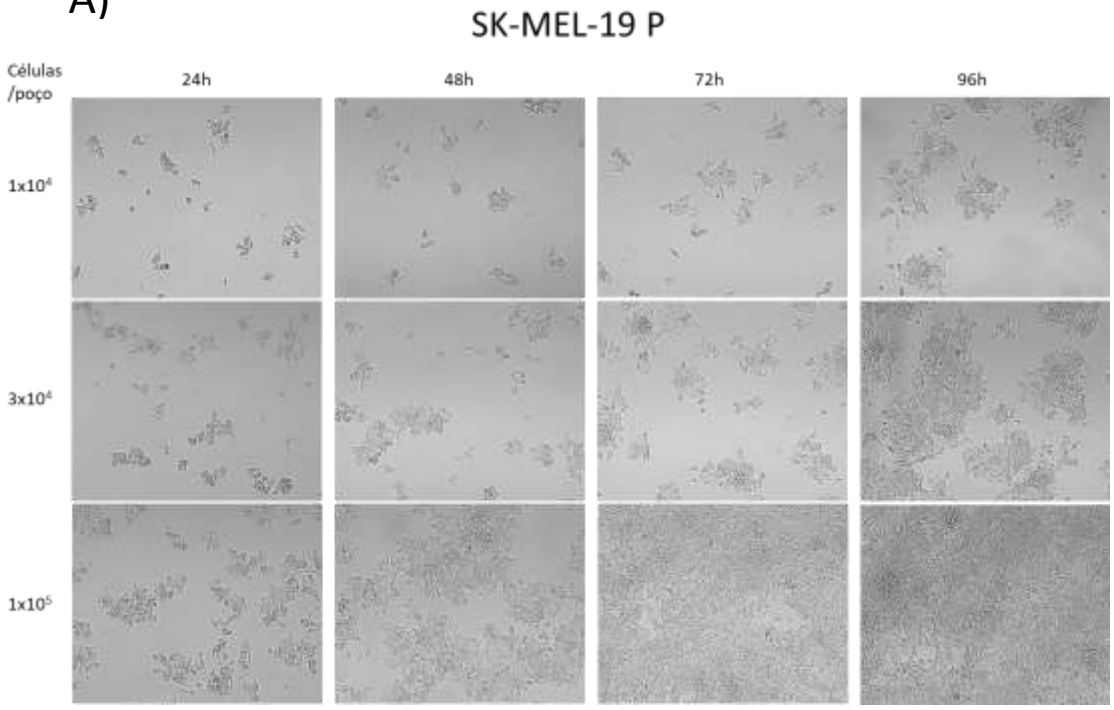
APÊNDICE A4. Viabilidade das linhagens SK-MEL-29 P (A), SK-MEL-29 R (B) e SK-MEL-29 DR (C) com o ensaio de exclusão do azul de tripan em três confluências diferentes ($1x10^4$, $3x10^4$ e $1x10^5$ células por poço) nos períodos de 24, 48, 72 e 96h



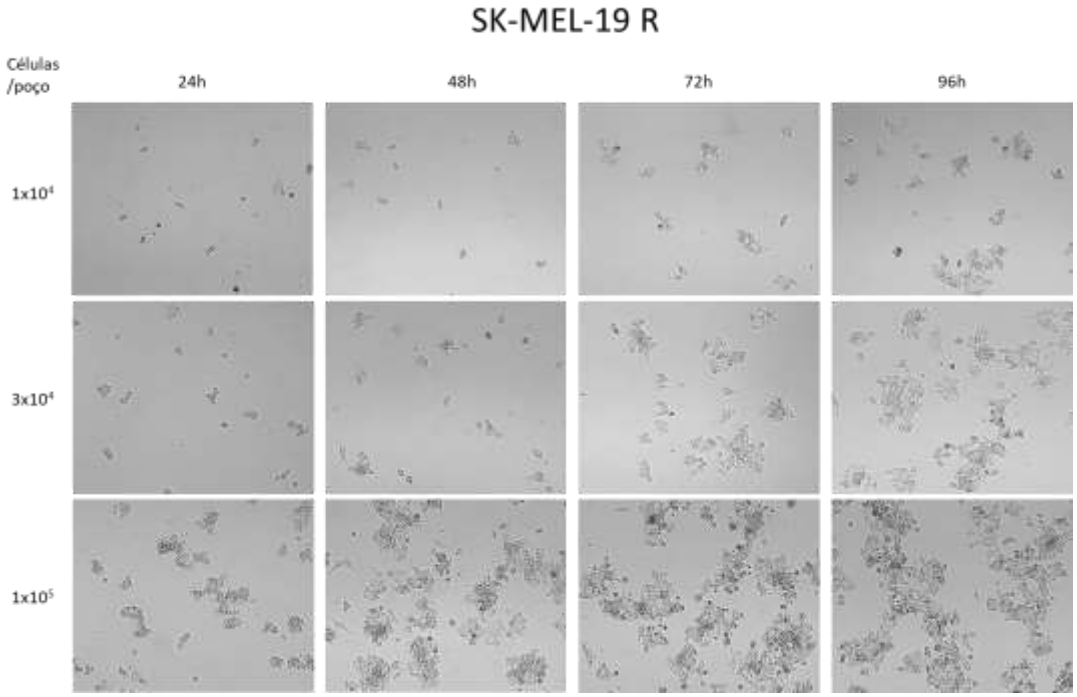
O tempo (h) de contagem foi apresentado no eixo x e o número de células obtidas separadamente (células vivas e mortas) no eixo y.

APÊNDICE A5. Fotografias das linhagens SK-MEL-19 P (A), SK-MEL-19 R (B), SK-MEL-19 DR (C), SK-MEL-29 P (D), SK-MEL-29 R (E) e SK-MEL-29 DR (F) em três confluências diferentes ($1x10^4$, $3x10^4$ e $1x10^5$ células por poço) obtidas durante o experimento de curva de crescimento com o ensaio de exclusão de azul de tripan após o período de 24, 48, 72 e 96h. Aumento de 100x

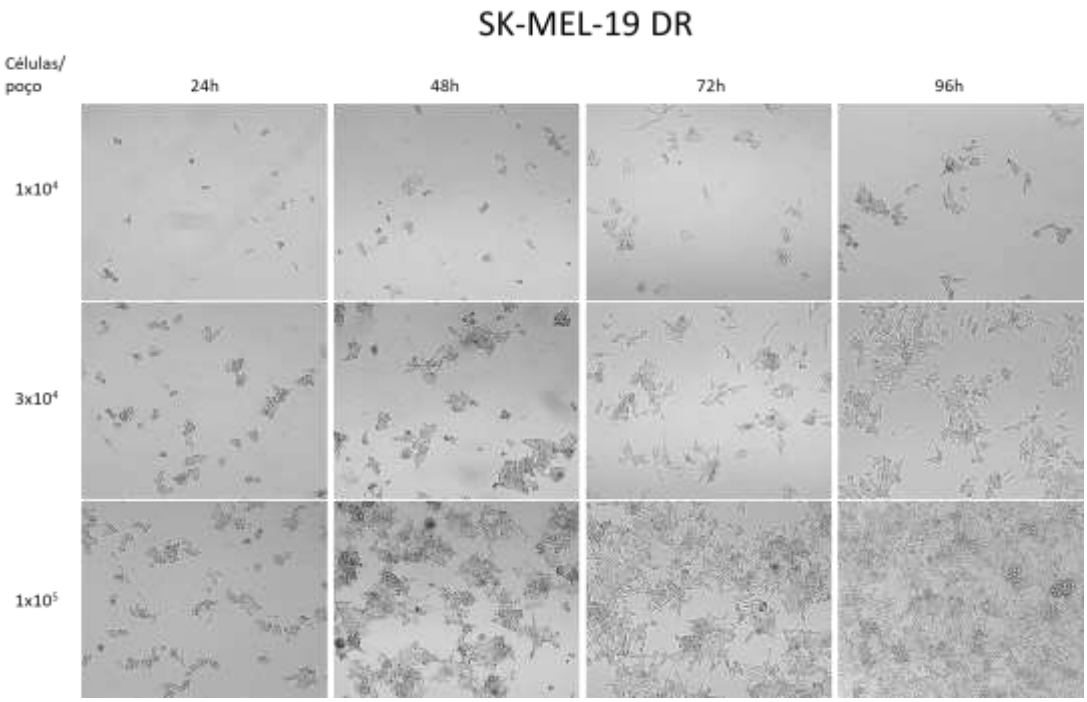
A)



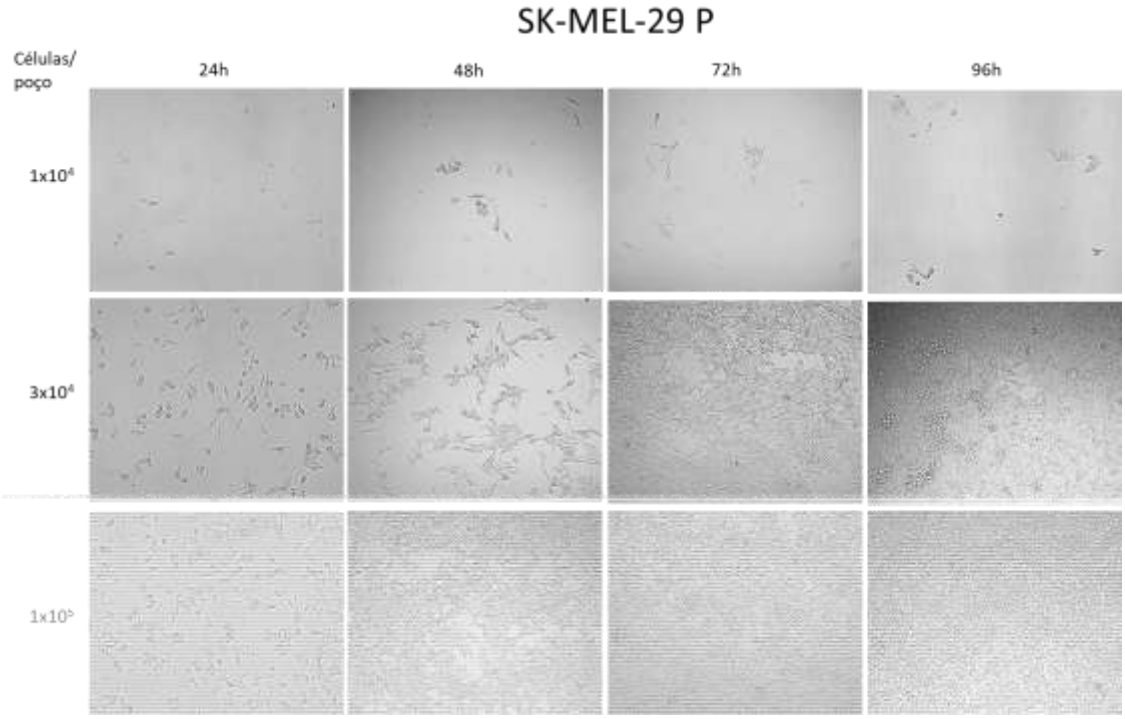
B)



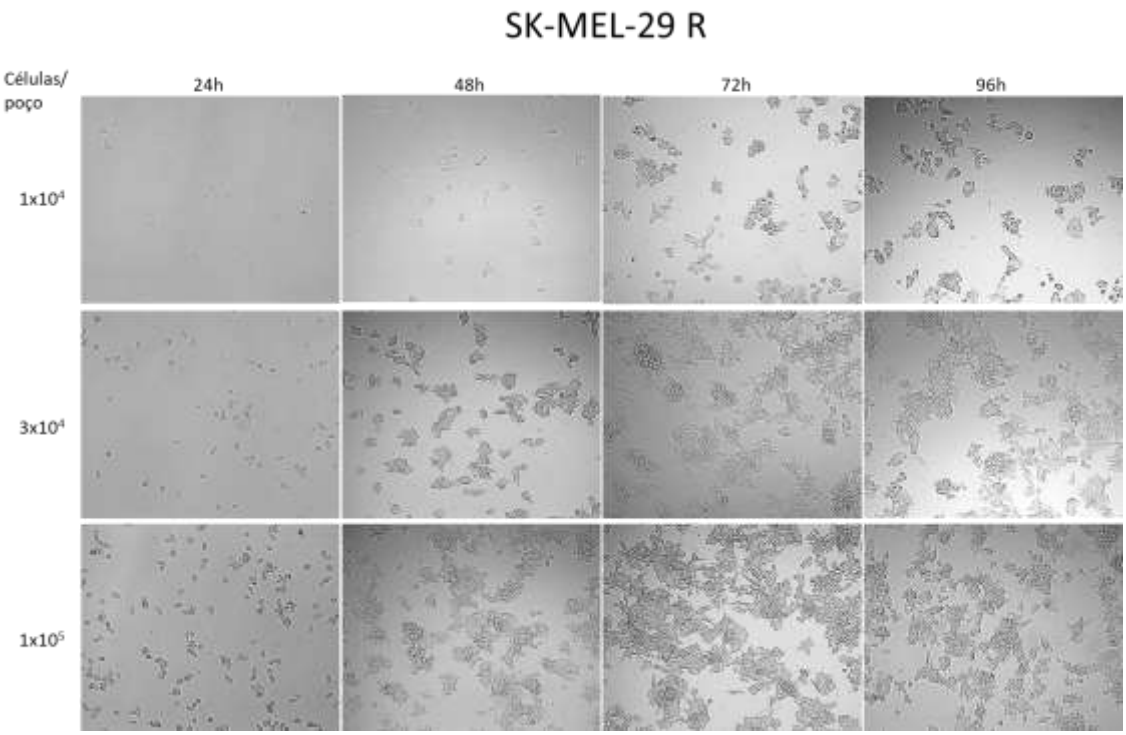
C)


SK-MEL-19 DR
Células/ poço
24h
48h
72h
96h
1x10⁴
3x10⁴
1x10⁵

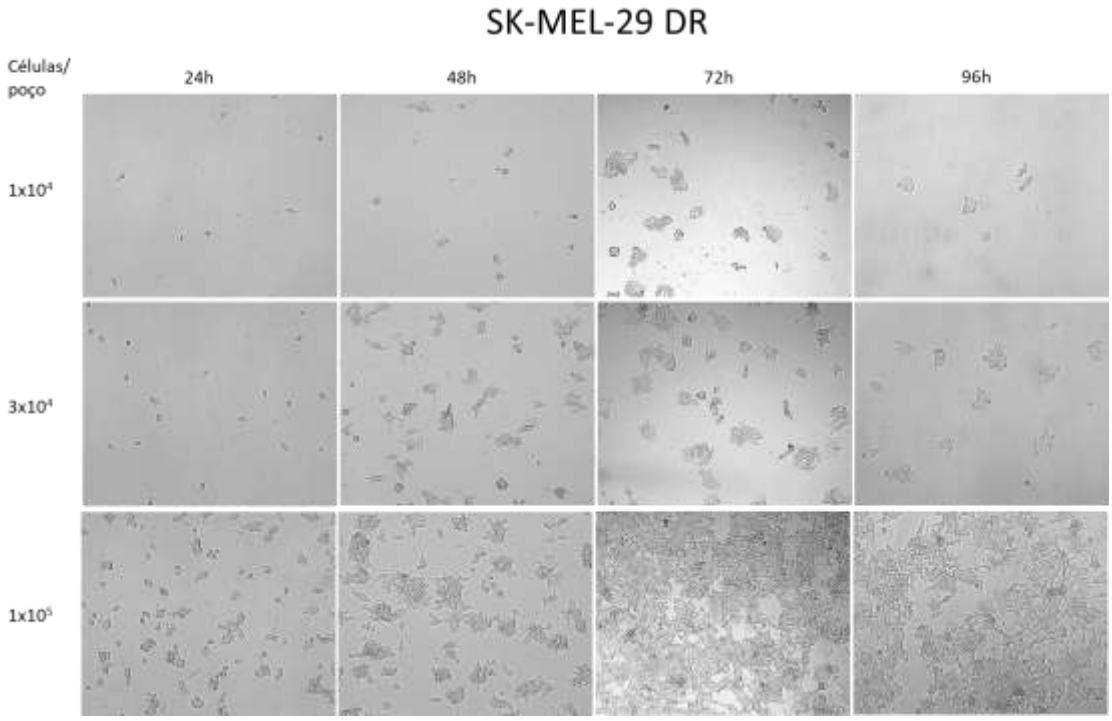
D)


SK-MEL-29 P
Células/ poço
24h
48h
72h
96h
1x10⁴
3x10⁴
1x10⁵

E)


SK-MEL-29 R
Células/ poço
24h
48h
72h
96h
1x10⁴
3x10⁴
1x10⁵

F)


SK-MEL-29 DR
Células/ poço
24h
48h
72h
96h
1x10⁴
3x10⁴
1x10⁵

APÊNDICE A6. Tabela da pesagem dos animais e dos órgãos no dia da eutanásia

		Peso (g)				
Grupos/ Animal	**Data da eutanásia**	**Corpóreo**	**Pulmão**	**Fígado**	**Rim**	**Cérebro**
NT I	23/03/2017	17,6	0,11	0,84	0,21	0,37
NT II	23/03/2017	18,5	0,19	0,9	0,24	0,28
NT III	23/03/2017	21,8	0,15	1,1	0,31	0,43
NT IV	23/03/2017	18,4	0,12	0,82	0,22	0,42
NT V	23/03/2017	18,7	0,14	0,95	0,21	0,36
DMSO I	23/03/2017	17,8	0,12	0,9	0,21	0,37
DMSO II	23/03/2017	19,3	0,12	1,01	0,22	0,45
DMSO III	23/03/2017	19,2	0,2	1,03	0,29	0,39
DMSO IV	23/03/2017	18,6	0,16	0,92	0,21	0,37
DMSO V	23/03/2017	19,4	0,16	0,99	0,26	0,36
4NC I	23/03/2017	18,1	0,13	0,89	0,25	0,34
4NC II	23/03/2017	18,2	0,13	0,79	0,24	0,39
4NC III	23/03/2017	17,7	0,12	0,85	0,23	0,31
4NC IV	23/03/2017	17,6	0,12	0,92	0,23	0,41
4NC V	23/03/2017	18,4	0,13	0,92	0,23	0,37
4NC I	25/04/2017	19,9	0,16	1,06	0,25	0,45
4NC II	25/04/2017	17,3	0,12	0,89	0,25	0,44
4NC III	25/04/2017	17,4	0,14	1,00	0,21	0,4
4NC IV	25/04/2017	15,6	0,13	0,87	0,21	0,39
4NC V	25/04/2017	19,3	0,16	1,04	0,24	0,45

APÊNDICE A7. Tabela da contagem de diferentes células da medula óssea por citometria de fluxo

Parâmetros ($x10^6/mm^3$)		**NT***	**DMSO**	**4-NC**	**4-NC tardio**
Células tronco hematopoéticas	Intervalo	0,017 - 0,021	0,012 - 0,021	0,00465 - 0,00787	0,012 - 0,023
	Média ± SD	0,019 ± 0,02	0,0172 ± 0,02	0,006864 ± 0,002	0,0146 ± 0,005
Progenitores hematopoéticos	Intervalo	0,032 - 0,038	0,030 - 0,042	0,040 - 0,046	0,037 - 0,055
	Média ± SD	0,0358 ± 0,004	0,0342 ± 0,005	0,0428 ± 0,003	0,0456 ± 0,006
Progenitores mielóides	Intervalo	2,21 - 2,43	1,79 - 2,00	1,77 - 2,22	1,56 - 2,87
	Média ± SD	2,342 ± 0,081	1,864 ± 0,084	1,996 ± 0,196	2,484 ± 0,537
Progenitores linfóides	Intervalo	0,036 - 0,051	0,00428 - 0,0428	0,00267 - 0,00764	0,03 - 0,041
	Média ± SD	0,0446 ± 0,006	0,013036 ± 0,019	0,005164 ± 0,002	0,035 ± 0,005
Granulócitos	Intervalo	13,4 - 20,7	11,1 - 18,6	14,6 - 41,0	16,1 - 23,5
	Média ± SD	16,06 ± 2,806	15,18 ± 2,688	28,12 ± 9,619	20,82 ± 3,342
Monócitos/ Macrófagos	Intervalo	3,44 - 5,75	2,88 - 4,01	2,72 - 3,96	1,51 - 3,9
	Média ± SD	4,44 ± 0,917	3,314 ± 0,450	3,294 ± 0,561	2,576 ± 0,856
Eritrócitos	Intervalo	34,8 - 49,4	34,7 - 40,5	22,3 - 31,2	21,7 - 35,7
	Média ± SD	41,94 ± 5,188	37,4 ± 2,289	26,74 ± 3,437	26,87 ± 5,626
Linfócitos B	Intervalo	1,13 - 1,86	0,87 - 1,27	0,78 - 1,99	1,00 - 2,42
	Média ± SD	1,542 ± 0,304	1,106 ± 0,179	1,08 ± 0,522	1,642 ± 0,563
Linfócitos T CD4	Intervalo	0,26 - 0,30	0,19 - 0,22	0,13 - 0,18	0,27 - 0,55
	Média ± SD	0,28 ± 0,016	0,202 ± 0,011	0,148 ± 0,019	0,36 ± 0,113
Linfócitos T CD8	Intervalo	0,18 - 0,27	0,11 - 0,26	0,13 - 0,22	0,17 - 0,54
	Média ± SD	0,236 ± 0,047	0,174 ± 0,055	0,158 ± 0,037	0,314 ± 0,139
Células NK*	Intervalo	0,054 - 0,063	0,013 - 0,022	0,022 - 0,032	0,053 - 0,082
	Média ± SD	0,0578 ± 0,003	0,0184 ± 0,003	0,025 ± 0,004	0,0636 ± 0,012

*NT – Animais não tratados; Células NK – *Natural Killer*

APÊNDICE A8. Tabela da contagem de diferentes células da medula óssea por mielograma

Parâmetros ($x10^6/mm^3$)		NT*	DMSO	4-NC	4-NC tardio
Celularidade da MO	Intervalo	4,0 - 7,9	4,7 - 5,9	4,7 - 6,2	4,1 - 5,9
	Média ± SD	5,8 ± 1,56	5,44 ± 0,49	5,52 ± 0,59	4,86 ± 0,68
Blastos	Intervalo	0,16 - 0,18	0,14 - 0,16	0,13 - 0,17	0,08 - 0,16
	Média ± SD	0,17 ± 0,012	0,15 ± 0,012	0,15 ± 0,020	0,12 ± 0,040
Promielócitos	Intervalo	0,1 - 0,24	0,14 - 0,2	0,13 - 0,2	0,07 - 0,16
	Média ± SD	0,18 ± 0,072	0,17 ± 0,031	0,17 ± 0,035	0,11 ± 0,047
Mielócitos	Intervalo	0,07 - 0,2	0,08 - 0,20	0,14 - 0,26	0,11 - 0,22
	Média ± SD	0,12 ± 0,068	0,15 ± 0,064	0,19 ± 0,062	0,15 ± 0,059
Metamielócitos	Intervalo	0,20 - 0,32	0,22 - 0,27	0,18 - 0,38	0,11 - 0,29
	Média ± SD	0,27 ± 0,062	0,25 ± 0,026	0,26 ± 0,106	0,19 ± 0,093
Bastonetes	Intervalo	0,41 - 0,64	0,38 - 0,55	0,44 - 0,48	0,28 - 0,50
	Média ± SD	0,53 ± 0,116	0,48 ± 0,087	0,47 ± 0,023	0,40 ± 0,111
Segmentados	Intervalo	2,19 - 2,59	1,85 - 2,28	2,10 - 2,49	1,82 - 2,23
	Média ± SD	2,4 ± 0,201	2,11 ± 0,231	2,35 ± 0,217	2 ± 0,210
Monócitos	Intervalo	0,14 - 0,25	0,08 - 0,14	0,05 - 0,20	0,07 - 0,11
	Média ± SD	0,20 ± 0,057	0,12 ± 0,035	0,14 ± 0,081	0,10 ± 0,031
Linfócitos	Intervalo	0,27 - 0,55	0,36 - 0,37	0,25 - 0,3	0,2 - 0,41
	Média ± SD	0,38 ± 0,149	0,37 ± 0,006	0,27 ± 0,029	0,3 ± 0,105
Plasmócitos	Intervalo	0 - 0,02	0 - 0,02	0 - 0,02	0 - 0,04
	Média ± SD	0,013 ± 0,012	0,007 ± 0,012	0,007 ± 0,012	0,02 ± 0,020
Eosinófilos	Intervalo	0,24 - 0,32	0,14 - 0,31	0,24 - 0,31	0,20 - 0,31
	Média ± SD	0,28 ± 0,040	0,22 ± 0,085	0,28 ± 0,038	0,25 ± 0,057
Basófilos	Intervalo	0 - 0,02	0 - 0,02	0 - 0,01	0 - 0,02
	Média ± SD	0,007 ± 0,012	0,007 ± 0.012	0,003 ± 0,006	0,007 ± 0,012
Proeritroblastos	Intervalo	0,14 - 0,23	0,1 - 0,14	0,15 - 0,25	0,07 - 0,16
	Média ± SD	0,19 ± 0,046	0,12 ± 0,020	0,20 ± 0,050	0,107 ± 0,047
Eritroblastos basófilos	Intervalo	0,32 - 0,44	0,26 - 0,29	0,23 - 0,36	0,15 - 0,31
	Média ± SD	0,387 ± 0,061	0,277 ± 0,015	0,297 ± 0,065	0,227 ± 0,080
Eritroblastos policromáticos	Intervalo	0,36 - 0,78	0,33 - 0,67	0,31 - 0,49	0,30 - 0,43
	Média ± SD	0,58 ± 0,211	0,52 ± 0,173	0,37 ± 0,104	0,377 ± 0,068
Eritroblastos ortocromáticos	Intervalo	0,61 - 1,09	0,7 - 0,81	0,41 - 0,86	0,43 - 0,49
	Média ± SD	0,78 ± 0,266	0,69 ± 0,125	0,63 ± 0,225	0,46 ± 0,031
Megacariócitos basófilos	Intervalo	0,02 - 0,03	0 - 0,02	0 - 0,02	0,02 - 0,04
	Média ± SD	0,023 ± 0,006	0,013 ± 0,012	0,01 ± 0,010	0,027 ± 0,012
Megacariocitos acidófilos	Intervalo	0,09 - 0,11	0,1 - 0,12	0,06 - 0,11	0,07 - 0,08
	Média ± SD	0,1 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,087 ± 0,025	0,08 ± 0,01

*NT – Animais não tratados

APÊNDICE A9. Tabela da contagem dos parâmetros hematológicos

Parâmetros ($x10^6/mm^3$)		NT*	DMSO	4-NC	4-NC tardio
Leucócitos ($x10^3/mm^3$)	Intervalo	1,1 - 2,0	1,7 - 2,3	1,25 - 2,3	1,25 - 2,30
	Média ± SD	1,48 ± 0,416	2,02 ± 0,266	1,75 ± 0,395	1,54 ± 0,435
Hemácias	Intervalo	4,86 - 5,55	4,19 - 5,05	4,90 - 5,44	4,45 - 5,29
	Média ± SD	4,972 ± 0,343	4,634 ± 0,353	5,2 ± 0,198	4,865 ± 0,82
Hemoglobina (g/dL)	Intervalo	7,25 - 8,15	7,15 - 8,75	8,25 - 9	8,05 - 9,40
	Média ± SD	7,43 ± 0,525	7,93 ± 0,709	8,67 ± 0,284	8,5 ± 0,752
Hematocrito (%)	Intervalo	21,9 - 26,4	19,85 - 23,25	22,1 - 24,75	21,2 - 24,3
	Média ± SD	23,34 ± 1,818	21,76 ± 1,465	23,8 ± 1,009	22,58 ± 1,581
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	Intervalo	155 - 439	439,5 - 607	560,5 - 705	456,5 - 705
	Média ± SD	358,9 ± 116,60	516,7 ± 73,952	626,5 ± 57,178	580,3 ± 90,69
VCM* (fL)	Intervalo	46,5 - 47	46 - 48	45 - 46,5	46 - 48,5
	Média ± SD	46,8 ± 0,447	47,1 ± 0,742	45,8 ± 0,570	46,6 ± 1,084
HCM* (pg)	Intervalo	13,45 - 16,75	16,2 - 17,6	16,2 - 17,05	16,2 - 18,45
	Média ± SD	15,13 ± 1,508	17,13 ± 0,556	16,68 ± 0,333	17,55 ± 1,005
CHCM* (%)	Intervalo	28,65 - 36,05	34,05 - 37,45	35,25 - 36,75	35,25 - 39,7
	Média ± SD	32,34 ± 3,370	36,45 ± 1,451	36,47 ± 0,785	37,89 ± 2,001
Neutrófilos %	Intervalo	9,0 - 14,0	7,0 - 14,0	10,0 - 18,0	11,0 - 16,0
	Média ± SD	11 ± 1,87	11,4 ± 2,70	13,6 ± 3,36	13,4 ± 2,07
Neutrófilos ($/mm^3$)	Intervalo	103,5 - 220	126 - 270	165 - 270	150 - 368
	Média ± SD	166,7 ± 68,54	230,7 ± 59,872	240,3 ± 98,963	210,9 ± 89,89
Linfócitos %	Intervalo	83 - 89	85 - 91	81 - 89	82 - 88
	Média ± SD	87 ± 2,345	86,8 ± 2,490	85,4 ± 3,782	84,4 ± 2,608
Linfócitos ($/mm^3$)	Intervalo	968 - 1535,5	1462 - 2001	1025 - 1863	1050 - 1886
	Média ± SD	1282,5 ± 339,54	1751,2 ± 215,03	1493,6 ± 327,50	1296,2 ± 345,2
Monócitos %	Intervalo	1,0 - 3,0	0 - 3,0	1,0 - 2,0	1,0 - 4,0
	Média ± SD	2 ± 1	2 ± 1.225	1,2 ± 0,447	2,4 ± 1.140
Monócitos ($/mm^3$)	Intervalo	11,0 - 55,5	0 - 69,0	16,0 - 25,0	15,0 - 50,0
	Média ± SD	30,8 ± 18,824	42,7 ± 28,186	20 ± 3,953	35,5 ± 14,629

*NT – Animais não tratados; VCM – Volume Corpuscular Médio; HCM – Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

APÊNDICE A10. Tabela de análise das enzimas de bioquímica clínica

Parâmetros		NT*	DMSO	4-NC	4-NC tardio
AST*	Intervalo	27,0 - 35	26,0 - 62,0	25,0 - 35,0	25,0 - 38,0
	Média ± SD	31,25 ± 3,50	38,25 ± 16,26	28,8 ± 3,96	29,6 ± 5,13
ALT*	Intervalo	84 - 146	103 - 239	89 - 143	94 - 199
	Média ± SD	121,25 ± 27,023	142,5 ± 64,563	108,2 ± 22,709	121 ± 44,537
Fosfatase Alcalina	Intervalo	107 - 155	93 - 146	86 - 93	64 - 91
	Média ± SD	121,8 ± 19,097	110,2 ± 22,332	91,5 ± 4,655	77,4 ± 11,971
Uréia	Intervalo	37 - 56	35 - 53	40 - 55	52 - 62
	Média ± SD	47,8 ± 6,834	42,2 ± 7,328	46 ± 5,874	57,6 ± 4,037
Creatinina	Intervalo	0,18 - 0,58	0,20 - 0,41	0,16 - 0,23	0,17 - 0,25
	Média ± SD	0,286 ± 0,166	0,26 ± 0,086	0,196 ± 0,030	0,212 ± 0,036

*NT – Animais não tratados; AST – Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotransferase.

ANEXOS

ANEXO A. Pareceres da Comissão de Ética no Uso Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/70/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Avaliação in vivo do potencial antimelanoma do 4-nerolidilcatecol em camundongos Athymic nude (Projeto de Desenvolvimento Tecnológico Industrial INCT-if - CNPq)"** (Protocolo CEUA/FCF/368), de responsabilidade da **Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros,** está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 06 de agosto de 2012.

São Paulo, 06 de agosto de 2012.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Oficio CEUA/FCF **108.2014-P368**

São Paulo, 15 de outubro de 2014.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 10 de outubro de 2014, **aprovou** as alterações propostas para o projeto de pesquisa "**Avaliação in vivo do potencial antimelanoma do 4-nerolidilcatecol em camundongos Athymic nude (Projeto de Desenvolvimento Tecnológico Industrial INCT-if - CNPq)**" (Protocolo CEUA nº 368), a saber: modificação do veículo para solubilização de 4-NC; alteração do delineamento experimental; e inclusão de análises com auxílio de F18-FDG, conforme constante nos documentos apresentados.

Cordialmente,

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros
FBC/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fone/Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF **50.2016-P368**

São Paulo, 22 de agosto de 2016.

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 19 de agosto de 2016, **aprovou** as alterações propostas para o projeto de pesquisa "**Avaliação in vivo do potencial antimelanoma do 4-nerolidilcatecol em camundongos Athymic nude (Projeto de Desenvolvimento Tecnológico Industrial INCT-if - CNPq)**" (Protocolo CEUA nº 368), a saber: prorrogação do prazo de validade, modificação de via de administração, inclusão de novos procedimentos/ensaios e inclusão de mais 35 animais (BALB, fêmeas), conforme constante nos documentos apresentados.

Cordialmente,

Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Vice-Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros
FBC/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fone/Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO B. Currículo Lattes

Currículo Lattes

Débora Kristina Alves Fernandes

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/2696758005385182

Última atualização do currículo em 07/03/2018

Resumo informado pelo autor

Doutoranda em Fisiopatologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, Mestre em Ciências - área de Toxicologia - FCF/ USP (2011), graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura (2006) e Bacharelado (2007) pelo Centro Universitário Fundação Santo André. Tem experiência nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Microbiologia, Toxicologia Ambiental com ênfase em Mutagênese, e Imunogenética. É bolsista FAPESP, atuando em pesquisa com ensaios pré-clínicos para a seleção de novas moléculas para o tratamento de melanoma (in vitro e in vivo). Realizou doutorado sanduíche por 6 meses no "The Wistar Institute" com pesquisas sobre microambiente tumoral.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Débora Kristina Alves Fernandes

Dados pessoais

Nascimento 27/04/1981 - São Paulo/SP - Brasil

CPF 217.179.378-37

Formação acadêmica/titulação

2013 Doutorado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
com **período sanduíche** em Wistar Institute, The (Orientador : Ashani T. Weeraratna)
Título: Avaliação do potencial de superação da quimioterapêutica do melanoma ao inibidor de BRAF/MEK (Vemurafenibe) e inibidor da MEK (Trametinibe) utilizando terapia combinatória com 4-nerolidylcatechol (4-NC)

Orientador: Silvya Stuchi Maria Engler
Co-orientador: Silvia Berlanga de Moraes Barros
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2009 - 2011 Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Toxicologia.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Aplicabilidade de combinações seletivas de linhagens S. typhimurium na caracterização de mutagenicidade do ar, Ano de obtenção: 2011

Orientador: Gisela de Angelis Umbuzeiro
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2007 - 2007 Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado.
Centro Universitário Fundação Santo André, CUFSA, Santo André, Brasil
Título: Expressão de IL-10 e de seu receptor: relação com doença do enxerto contra o hospedeiro.
Orientador: Dra Maria Gorbase de Lima

2003 - 2006 Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura.
Centro Universitário Fundação Santo André, CUFSA, Santo André, Brasil

Formação complementar

2011 - 2011 Barreiras/Bons de Expos e Efeito na Seg. da Água... (Carga horária: 4h).
Centro de Vigilância Epidemiológica, CVE, Brasil

2011 - 2011 Novos cons. na Av de Riscos à Saúde H na q d água... (Carga horária: 4h).
Centro de Vigilância Epidemiológica, CVE, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Avaliação de Genotoxicidade... (Carga horária: 32h).
Mutagen - Brasil, MUTAGEN, Rosemar Preto, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Estimativa de Emissões de Poluentes Atmosféricos. (Carga horária: 28h).
Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Wistar Institute, The - -

Vínculo institucional

2017 - 2018 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiaria voluntária , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva .

3. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: Aperfeiçoamento , Enquadramento funcional: Bolsista OTI , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva .

3. Centro Universitário Senac - SENAC/SP

Vínculo institucional

2008 - 2010 Vínculo: Outro (especifique) , Enquadramento funcional: Funcionário , Carga horária: 40, Regime: Integral

4. Escola Estadual Sada Umeizaw - E E SADA UMEIZAW

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Professor Eventual , Enquadramento funcional: Professor de Biologia e Ciências Biológicas , Carga horária: 20, Regime: Parcial
Outras informações:
Trabalhei como professora eventual ministrando aulas de biologia

5. Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Outro (especifique) , Enquadramento funcional: Estágio , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva .

6. Centro Universitário Fundação Santo André - CUFSA

Vínculo institucional

2004 - 2007 Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Monitor , Carga horária: 8, Regime: Parcial
Outras informações:
Monitoria de Geologia Ambiental

7. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB

Vínculo institucional

2004 - 2006 Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 30, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Estágio no Setor de Toxicologia Ambiental, no laboratório de Mutagênese e Citotoxicidade (Teste de Ames)

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. DOI MASSARO, R.R.; FAIÃO-FLORES, F.; REBECCA, V.W.; SANDRI, S.; **ALVES-FERNANDES, D.K.**; PENNACCHI, P.C.; SMALLEY, K.S.M.; MARIA-ENGLER, S.S.
Inhibition of proliferation and invasion in 2D and 3D models by 2-methoxyestradiol in human melanoma cells. PHARMACOLOGICAL RESEARCH. JCR v. 119, p.242 - 250, 2017.

2. DOI FAIÃO-FLORES, F.; **ALVES-FERNANDES, D.K.**; PENNACCHI, P.C.; SANDRI, S.; VICENTE, A.L.S.A.; SCAPULATEMPO-NETO, C.; VAZQUEZ, V.L.; REIS, R.M.; CHAUHAN, J.; GODINO, C.R.; SMALLEY, K.S.; MARIA-ENGLER, S.S.
Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. ONCOGENE. JCR v.36, p.1949 - 1961, 2017.

3. DOI OLIVEIRA, ÉRICA APARECIDA DE; LIMA, DIOGENES SAULO DE; CARDOZO, LUCAS EFTEVES; SOUZA, GARCIA FERREIRA DE; DE SOUZA, NAYANE; **ALVES-FERNANDES, DEBORA KRISTINA**; FAIÃO-FLORES, FERNANDA; QUINCOCES, JOSÉ AGUSTIN PABLO; BARROS, SILVIA BERLANDA DE MORAES; NAKAYA, HELOER I.; MONTEIRO, GISELE; MARIA-ENGLER, SILVYA STUCHI
Toxicogenomic and bioinformatics platforms to identify key molecular mechanisms of a curcumin-analogue DM-1 toxicity in melanoma cells. PHARMACOLOGICAL RESEARCH. JCR v.125, p.178 - 187, 2017.

4. DOI SANDRI, SILVANA; FAIÃO-FLORES, FERNANDA; TIAGO, MANDELA; PENNACCHI, PAULA COMUNE; MASSARO, RENATO RAMOS; **ALVES-FERNANDES, DÉBORA KRISTINA**; BERARDINELLI, GUSTAVO NORIZ; EVANGELISTA, ADRIANE FEIJÓ; DE LIMA VAZQUEZ, VINICIUS; REIS, RUI MANUEL; MARIA-ENGLER, SILVYA STUCHI
Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. PHARMACOLOGICAL RESEARCH. JCR v.111, p.525 - 533, 2016.

5. DOI ALVES, D. K. M.; KUMMROW, Fábio; CARDOSO, ARNALDO A.; MORALES, DANIEL A.; UMBUZEIRO, G.A.
Mutagenicity profile of atmosphéric particulate matter in a small urban center subjected to airborne emission from vehicle traffic and sugar cane burning. ENVIRONMENTAL AND MOLECULAR MUTAGENESIS. JCR v.57, p.41 - 50, 2016.

6. DOI UMBUZEIRO, GISELA A.; KUMMROW, FÁBIO; MORALES, DANIEL ALEXANDRE; **ALVES, DEBORA KRISTINA M.**; LIM, HWANMI; JARVIS, IAN W.H.; BERGVALL, CHRISTOFFER; WESTERHOLM, RODER; STENIUS, ULLA; DREU, KRISTIAN
Sensitivity of salmonella YG5161 for detecting PAH-associated mutagenicity in air particulate matter. Environmental and Molecular Mutagenesis (Print). JCR v.55, p.510 - 517, 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. FAIAO-FLORES, F.; **ALVES, D. K. M.**; GANDRI, S.; MARIA-ENGLER, S. S.
Epithelial-mesenchymal transition as an alternative pathway in vemurafenib and vemurafenib/trametinib-chemoresistant melanoma In: Society for Melanoma Research 2014 Congress, 2014, Zurique.
Pigment Cell & Melanoma Research. Estados Unidos: Wiley, 2014. v.27, p.1190 - 1190

2. **ALVES, D. K. M.**; FAIAO-FLORES, F.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S.
Tumoral growth inhibition by 4-nerolidylcatechol (4-NC) in a melanoma tumor model in vivo In: Society for Melanoma Research, 2014, Zurique.
Pigment Cell & Melanoma Research. Estados Unidos: Wiley, 2014. v.27, p.1170 - 1170

3. BERGAMASSO, A. M.; ALVES, D. K. M.; RECH, C. M.; UMBUZEIRO, G. A.
EMPREGO DE DIFERENTES LINHAGENS DE *Salmonella typhimurium* NO TESTE SALMONELLA/MICROSSOMA PARA INDICAR A CLASSE DE COMPOSTOS MUTAGÊNICOS PRESENTES EM EFLUENTES INDUSTRIAIS. In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte-MG.
Revista Brasileira de Toxicologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2009. v.22, p.79 - 79

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 14/04/2018 às 10:29:20.

ANEXO C. Ficha do Aluno

14/04/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 6720495/1 - Débora Kristina Alves Fernandes

Email:	debora.kalves@usp.br
Data de Nascimento:	27/04/1981
Cédula de Identidade:	RG - 32.966.531-5 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Licenciada em Ciências Biológicas - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - Centro Universitário Fundação Santo André - São Paulo - Brasil - 2007
Graduação:	Bacharel em Ciências Biológicas - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - Centro Universitário Fundação Santo André - São Paulo - Brasil - 2008
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Toxicologia e Análises Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Fisiopatologia
Data de Matrícula:	20/12/2013
Início da Contagem de Prazo:	20/12/2013
Data Limite para o Depósito:	19/04/2018
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Silvya Stuchi Maria Engler - 10/08/2016 até o presente. Email: silvya@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 20/12/2013
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 20/12/2017 até 19/04/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 11/02/2016
Estágio no Exterior:	The Wistar Institute of Anatomy and Biology, Estados Unidos da América - Período de 01/08/2017 até 31/01/2018
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 Ocorrências:	Primeira Matrícula em 20/12/2013 Prorrogação em 13/06/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018
Impresso em: 14/04/2018 10:50:48

14/04/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 6720495/1 - Débora Kristina Alves Fernandes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
ICB5732-1/1	Câncer como Doença Infecciosa (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	10/03/2014	04/05/2014	120	8	100	A	N	Concluída
QBQ5802-4/2	Metodologias em Bioquímica e Biologia Molecular: Conceitos e Aplicações (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	21/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5792-3/1	Tópicos em Análises Clínicas III	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5766-4/1	Tópicos em Análises Clínicas IV	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5734-3/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
BMI5853-4/1	Imunobiologia dos Tumores (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	20/11/2015	14/12/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5753-3/2	Processos de Invasão Celular	01/03/2016	11/04/2016	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	26
Estágios:			
Total:	0	20	26

Créditos Atribuídos à Tese: 167

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 05/02/2018
Impresso em: 14/04/2018 10:50:48