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

**Efeitos citotóxicos do DM-1 em células de melanoma
resistentes a um inibidor de BRAF e na expressão de
metaloproteinases**

Nayane de Souza

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre junto ao Programa de Pós-graduação
em Farmácia- Fisiopatologia e Toxicologia

Orientadora:

Prof. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

Co-orientadora:

Dra. Fernanda Faião-Flores.

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia

**Efeitos citotóxicos do DM-1 em células de melanoma
resistentes a um inibidor de BRAF e na expressão de
metaloproteinases**

Nayane de Souza

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre junto ao Programa de Pós-graduação
em Farmácia- Fisiopatologia e Toxicologia

Orientadora:

Prof. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler

Co-orientadora:

Dra. Fernanda Faião-Flores.

São Paulo

2017

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

S719e Souza, Nayane
Efeitos citotóxicos do DM-1 em células de melanoma resistentes a um inibidor de BRAF e na expressão de metaloproteinases / Nayane Souza. - São Paulo, 2017.
130 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi
Coorientador: Faíão-Flores, Fernanda

1. Melanoma. 2. Quimiorresistência. 3. Vemurafenibe. 4. Curcumina. 5. Metaloproteinases.
I. T. II. Maria-Engler, Silvy Stuchi, orientador.
III. Faíão-Flores, Fernanda, coorientador.

Nayane de Souza

**Efeitos citotóxicos do DM-1 em células de melanoma
resistentes a um inibidor de BRAF e na expressão de
metaloproteinases**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria Engler

orientadora/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

À minha família pelo amor incondicional. Aos meus pais pela sabedoria,
grande exemplo em minha vida e por sempre acreditarem em mim,
vocês sempre me guiaram para que fosse fiel aos meus ideais. Ao meu
irmão, Mattheus, grande amor e orgulho da minha vida, seu carinho,
amor e amizade foram decisivos para que continuasse lutando.

Ao amor da minha vida, Danilo, sua presença, compreensão, paciência, confiança e ajuda incondicional foram fundamentais para conclusão deste trabalho, serei eternamente grata por acreditar em mim quando eu não mais acreditava.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo amor e incentivo durante todos esses anos, vocês são verdadeiros guerreiros e, mesmo frente às dificuldades, sempre estiveram a meu lado apoiando meus sonhos. Obrigada por me guiarem nesta vida e me ensinarem a ser fiel àquilo que acredito.

Ao meu irmão, Mattheus, que é o grande amor da minha vida, você sempre acreditou em mim mais que eu mesma e sempre esteve a meu lado e, ainda que adolescente me confortou inúmeras vezes com uma maturidade inacreditável, ter você a meu lado foi decisivo para continuar lutando. Aos meus lindos cachorros Tobby, Mel e Panda chegar, sair de casa às 8, chegar meia noite e vê-los correndo e abanando o rabinho, com certeza, fizeram minhas noites mais felizes. receberam com o rabinho abanando e me animaram mesmo nos dias mais cansativos e estressantes.

Aos meus avós por serem exemplo de superação, o amor deles é inspirador, criaram uma família linda da qual me orgulho por fazer parte. Aos meus tios, tias e primos que mesmo longe fisicamente sempre fizeram questão de demonstrar todo o amor e amizade.

Aos meus padrinhos que sempre estiveram a meu lado, me deram o ombro quando necessário e nem pouparam esforços para me ajudar.

Aos amigos que ganhei durante a vida, Elaine, Ligia, Bruno, Amauri e Nucquandala, serei eternamente grata por todo o amor e paciência, mesmo distantes sempre estiveram presentes com palavras, carinho e amor.

Ao amor da minha vida e grande amigo, Dan, que me acompanhou durante os momentos mais difíceis e ficou ao meu lado, quando duvidei que conseguiria você acreditou em mim, mostrou e viabilizou caminhos para que eu conseguisse concluir esta fase em minha vida. Obrigada por estar sempre perto, enxugar minhas lágrimas, colocar um sorriso em meu rosto e me alimentar com muitas delícias veganas, obrigada por mostrar que nenhuma dificuldade é eterna e que independente do que aconteça você estará a meu lado, obrigada por muitas vezes ter me lembrado qual o sentido da vida e os motivos pelos quais deveria continuar lutando, você me conheceu em uma das épocas

mais difíceis em minha vida e a transformou, me transformou. Serei eternamente grata por seu amor e amizade. Te amo Neno!

À Profa Silvy Stuchi, minha orientadora. Muito obrigada pela competência, confiança e paciência.

À co-orientadora Fernanda Faião-Flores por auxiliar-me durante este período.

Aos meus companheiros de laboratório por todos os momentos de alegria que tivemos e todas as conversas que contribuíram pessoalmente e profissionalmente. O grupo de corrida que começou no laboratório e, mesmo cansadas, íamos para o CEPEUSP correr e fazer os sete minutos. Aos meus companheiros de laboratório Gustavo, que começou a iniciação científica comigo e compartilhamos momentos de dúvida, medo e alegria durante a IC, Gabriela, Érica, Debs, Tati, Manu, Paula e Thalita obrigada pelos momentos de descontração e discussões. Agradeço especialmente a Érica por me acalmar nos momentos de desespero, contribuir imensamente com discussões riquíssimas sobre os dados do projeto e, claro, pela geração dos dados de PCR em tempo real e formação de tubos em células endoteliais. À Thalita pelas discussões e por sempre demonstrar grande amor pela ciência, seu entusiasmo e competência são um verdadeiro exemplo de profissionalismo. À Paula que, além de grande cientista, é uma pessoa pessoa admirável, me acolheu quando entrei no laboratório com seu jeito mineiro e me auxiliou muito no projeto, ouviu minhas ideias quando ainda fazia iniciação científica, sempre com muito respeito e grandes contribuições, suas palavras não somente me ajudaram a crescer profissionalmente, mas também pessoalmente, serei eternamente grata por todo cuidado e dedicação. À técnica Silvia que, além de uma profissional exemplar, é uma mulher de um coração enorme e sempre pronta a ajudar.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas por todo o suporte durante a realização deste trabalho.

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

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

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

“Aquele que luta com monstros deve acautelar-se para não se tornar também um monstro. Quando se olha muito tempo para um abismo, o abismo olha para você”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

SOUZA, Nayane de. **Efeitos citotóxicos do DM-1 em células de melanoma resistentes a um inibidor de BRAF e na modulação de metaloproteinases**. 2017. 130p. Dissertação (Mestrado em Farmácia na área de Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2017.

Melanoma é o câncer mais agressivo e a mutação BRAF V600E é a mais frequente entre os pacientes. O vemurafenibe foi o primeiro inibidor específico desta mutação aprovado pela Food and Drug Administration. Entretanto, após cerca de seis meses há recidiva e superar os mecanismos de resistência responsáveis por este fenômeno ainda é um desafio. A curcumina é um tumérico com características antitumorais e anti-inflamatórias, entretanto sua baixa biodisponibilidade e estabilidade limitam seu uso e por isso impulsionaram a busca por análogos capazes de serem eficientes e comercializados. O DM-1, é um análogo monocetônico que apresentou efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* em estudos anteriores. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos citotóxicos do DM-1 em células de melanoma sensíveis (naive) e resistentes ao vemurafenibe, bem como na modulação de metaloproteinases. As células de melanoma foram tratadas com diferentes concentrações de DM-1, e este composto foi citotóxico para linhagens sensíveis e resistentes ao vemurafenibe, além de induzir parada de ciclo celular em G1/G0 e diminuir o número de colônias, entretanto ele não foi seletivo em ensaios de citotoxicidade realizados com melanócitos e fibroblastos. O tratamento dessas células em doses subtóxicas resultou na modulação de metaloproteinases importantes no processo de invasão celular. O DM-1 reduziu as concentrações das metaloproteinases -1, -2 e -9 (MMP-1, -2 e -9) em um ensaio de quantificação de MMPs e a atividade das MMP-2 e -9 em um ensaio de zimografia de maneira célula dependente. As modulações negativas do inibidor de MMP TIMP-2 e MMP-14 para SKMEL-28 naive foram associadas a diminuição das atividades de MMP-2 e -9, enquanto que as modulações positivas para SKMEL-19 naive foram relacionadas ao aumento de MMP-2. Este composto ainda inibiu a migração das células e a formação de tubos por células endoteliais.

Palavras-chave: melanoma, inibição de BRAFV600E, análogos da curcumina, metaloproteinase, invasão.

ABSTRACT

SOUZA, Nayane de. **DM-1 cytotoxic effects in BRAF resistant melanoma cell lines and metalloproteinase expression modulation**. 2017. 130p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2017.

Malignant melanoma is the most aggressive cancer and the BRAF V600E mutation is the most frequent among patients. Vemurafenib was the first specific inhibitor for this mutation approved by Food and Drug Administration. Therefore around six months later there is relapse and overcoming it is still a challenge. Curcumin is a turmeric and it has been deeply researched because of its anti-inflammatory and antitumoral effects. However the low stability limits its use, therefore, encouraged the investigation of analogues capable to be efficient and commercialized. DM-1 is a monoketone curcumin analog and it showed antitumoral effects *in vitro* and *in vivo* in previous studies. The aim of this project was to evaluate the cytotoxic effects of DM-1 for vemurafenib responsive (naïve) and resistant melanoma cells, as well as metalloproteinases modulation. Melanoma cells were treated with different DM-1 concentrations, and this compound was cytotoxic for responsive and resistant cell lines, besides inducing G1/G0 cell cycle arrest and reducing the number of colonies, nonetheless it was not selective in assays performed with melanocytes and fibroblasts. Subtoxic treatment of those cells modulated important MMPs in the cell invasion process. DM-1 reduced metalloproteinases -1, -2 and -9 (MMP-1,-2 and -9) in a quantification assay, and MMP-2 and -9 activities by zymography in a cell-dependent way. Negative modulations of MMP inhibitor TIMP-2 and MMP-14 for SKMEL-28 naïve were associated with MMP-2 and -9 reduced activities, whereas positive modulations for SKMEL-19 naïve were correlated to MMP-2 increase. Furthermore, this compound reduced migration of those cells and endothelial cell tube formation.

Keywords: melanoma, BRAFV600E inhibitor, resistance mechanism, curcumin analogues, metalloproteinase, invasion.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Câncer e melanoma	15
1.1.1. Melanoma	16
1.1.1.1. Modelo de Clark e mecanismos moleculares	18
1.1.1.2. Melanoma e células-tronco	20
1.1.1.3. Tratamentos	24
1.2. Matriz metaloproteinases na progressão do melanoma	29
1.2.1. Metaloproteinase-2 (MMP-2)	37
1.2.2. Metaloproteinase-9 (MMP-9)	38
1.2.3. Metaloproteinase-1 (MMP-1)	38
1.2.4. Metaloproteinase de matriz associada à membrana -14 (MMP-14/ MT MMP-1)	40
1.2.5. Inibidor tecidual - 2 de MMP (TIMP-2)	41
1.3. Curcumina e seus análogos	42
1.3.1. Análogos da curcumina	46
2. OBJETIVOS	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1. DM-1: 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio	50
3.2. Análise por espectrometria de absorção do DM-1 em PBS e DMSO	50
3.3. Manutenção de culturas celulares	51
3.4. Obtenção das linhagens resistentes ao Vemurafenibe	51
3.5. Ensaio de viabilidade celular por MTT	52
3.6. Ensaio de viabilidade celular por ensaio de exclusão de Azul de Tripán	52
3.7. Externalização de fosfatidilserina e integridade de membrana celular	53
3.8. Análise de ciclo celular: fragmentação de DNA	53
3.9. Ensaio Clonogênico	54

3.10. Western blotting.....	54
3.10.1. Extração protéica.....	54
3.10.2. Fracionamento de proteínas utilizando eletroforese em gel de acrilamida e reação com anticorpo.....	55
3.11. Análise de expressão gênica através de PCR em tempo real	55
3.11.1. Extração do RNA total.....	55
3.11.2. Transcrição reversa (RT-PCR) para síntese de cDNA.....	56
3.11.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	56
3.12. Ensaio de migração por ferida.....	56
3.13. Preparo do <i>coating</i> de colágeno.....	57
3.14. Quantificação de MMP-1, MMP-2 e MMP-9.....	59
3.15. Zimografia.....	59
3.15.1. Obtenção das proteínas coletadas no meio de cultura	59
3.15.2. Mobilidade eletroforética das proteínas no gel de SDS-PAGE + gelatina.....	60
3.15.3. Incubação e revelação do gel.....	60
3.16. Ensaio de formação de tubos em células endoteliais.....	60
3.17. Análise estatística.....	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1. Estabilidade do DM-1 em solventes orgânico e aquoso.....	62
4.2. Estabilidade em meio de cultura.....	64
4.3. Ensaio de citotoxicidade colorimétrico- MTT.....	65
4.4. Ensaio de viabilidade celular – Azul de Tripán.....	69
4.5. Ensaio de externalização de fosfatidilserina.....	71
4.6. Seletividade.....	74
4.7. Ensaio clonogênico.....	78
4.8. Ensaio de ciclo celular.....	81
4.9. Metaloproteinase de matriz e inibidores na progressão do melanoma	84
4.9.1. Metaloproteinase-1 (MMP-1).....	84
4.9.2. Metaloproteinase-2 (MMP-2).....	85

4.9.2.1 Análise do sobrenadante de células cultivadas em placa de cultura.....	85
4.9.2.2. Análise do sobrenadante células cultivadas em <i>coating</i> de colágeno.....	87
4.9.3. Metaloproteinase-9 (MMP-9)	88
4.9.3.1. Análise do sobrenadante de células cultivadas em placa de cultura	88
4.9.3.2. Análise do sobrenadante de células cultivadas em <i>coating</i> de colágeno	90
4.9.4. Metaloproteinase de matriz associada à membrana-14 (MMP-14/ MT MMP-1).....	91
4.9.5. Inibidor tecidual -2 de MMP (TIMP-2)	92
4.10. Ensaio de migração.....	93
4.11. Ensaio de formação de tubos.....	96
5. CONCLUSÕES.....	99
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
7. ANEXO.....	126
7.1. Publicação em revista científica.....	126
7.2. Currículo Lattes.....	127
7.3. Ficha do aluno.....	1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e Melanoma

Atualmente o câncer figura como maior motivo de preocupação de saúde pública mundial e lidera as causas de morbidez e mortalidade no mundo, com aproximadamente 14 milhões de casos novos em 2012 e 8,8 milhões de mortes em 2015, acredita-se que o número de novos casos crescerá 70% nas próximas duas décadas (WHO 2017).

O câncer de pele pode ser caracterizado em basicamente em três categorias, carcinoma basocelular, carcinoma escamoso e melanoma. Os dois primeiros tipos são cânceres de pele do tipo não melanoma e são originários dos queratinócitos, o principal tipo celular na epiderme, juntos representam a malignidade mais comum em indivíduos caucasianos, cerca de 18 a 20 vezes mais que outros indivíduos, sendo que a sua incidência tem aumentado em diferentes países (CAINI et al 2016). Esta neoplasia gera grandes gastos nos cofres públicos, sendo que na Austrália é o tipo de câncer que representa o maior gasto em saúde pública, e nos Estados Unidos os gastos alcançaram 650 milhões de dólares em tratamento médico, cerca de 6 a 8 vezes do que os gastos destinados para o tratamento do tumor de pele do tipo melanoma. (APALLA et al 2017)

O melanoma possui baixa frequência (FIGURA 1), mas a alta possibilidade de metástases dificulta o tratamento dos pacientes, resultando em alta taxas de mortalidade (WHITEMAN et al 2001). Nos Estados Unidos, o melanoma representa atualmente 4,5 % de todos os novos casos de câncer esperados para 2016 e 1,7% de todas as mortes por câncer estimadas para 2016 (National Cancer Institute-SEER). No Brasil, o melanoma representa 3% das neoplasias malignas da pele, que correspondem 30% de todos os tumores malignos registrados no país. Na Figura 1 podemos observar a estimativa de diversos tipos de cânceres para o ano de 2016/2017 no Brasil e a incidência do melanoma para homens e mulheres.

Estimativa de novos casos de câncer para 2016/2017.

Localização primária	Casos novos	%		Localização primária	Casos novos	%
Mama feminina	57.960	28,1		Próstata	61.200	28,6
Cólon e reto	17.620	8,6		Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1
Colo do útero	16.340	7,9		Cólon e Reto	16.660	7,8
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3		Estômago	12.920	6
Estômago	7.600	3,7		Cavidade oral	11.140	5,2
Corpo do útero	6.950	3,4		Esôfago	7.950	3,7
Ovário	6.150	3		Bexiga	7.200	3,4
Glândula tireóide	5.870	2,9		Laringe	6.360	3
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4		Leucemias	5.540	2,6
Sistema nervoso central	4.830	2,3		Sistema nervoso central	5.440	2,5
Leucemias	4.530	2,2		Linfoma não Hodgkin	5.210	2,4
Cavidade oral	4.350	2,1		Pele melanoma	3.000	1,4
Esôfago	2.860	1,4		Linfoma de Hodgkin	1.460	0,7
Pele melanoma	2.670	1,3		Glândula tireóide	1.090	0,5
Bexiga	2.470	1,2				
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5				
Laringe	990	0,5				
Todas as neoplasias sem pele *	205.960			Todas as neoplasias sem pele *	214.350	
Todas as neoplasias	300.870			Todas as neoplasias	295.200	

Fonte: Instituto Nacional de Câncer

FIGURA 1: Publicação bienal do Instituto Nacional do Câncer (INCA) com informações atualizadas sobre o número de casos novos de câncer esperados os anos 2016 e 2017.

*Todas as neoplasias exceto pele não melanoma.

Fonte: Instituto Nacional de Câncer, 2017.

1.1.1 Melanoma

Os maiores fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma são histórico familiar, presença de múltiplos nevos, pele clara, exposição à radiação ultravioleta e imunossupressão. Estudos epidemiológicos mostraram que a exposição intensa à radiação solar e queimaduras decorrentes deste processo conferem maior risco de desenvolvimento de melanoma (WHITEMAN et al 2001). A exposição da pele à equipamentos de UVR destinados ao bronzamento artificial também está associada ao aparecimento de câncer de pele de maneira dose-dependente (BONIOL et al 2012).

Os nevos melanocíticos são neoplasmas resultantes da ploriferação de melanócitos, os quais são células presentes na pele responsáveis pela produção de melanina. Esses nevos são neoplasmas clonais com parada de ciclo celular, iniciado por mutações oncogênicas na via de MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases* - Proteína-quinases ativadas por mitógenos) (FIGURA 2) (Damsky, Bosenberg 2017). Dentre os

oncogenes com mutações, podemos destacar NRAS (em nevos melanocíticos congêntos), HRAS (em nevos de Spitz), BRAF (em nevos melanocíticos adquiridos, e GNAQ ou GNA11 (em nevos azuis) (BARAN; DUNCAN 2011). Aproximadamente 25-33% dos melanomas surgem a partir de nevos, sendo que as lesões mais comuns são nevos melanocíticos benignos adquiridos (DAMSKY, BOSENBERG 2017).

FIGURA 2: Envolvimento dos produtos de oito genes nas vias de transdução de sinal RAS/RAF/MEK/MAPK, PI3K/AKT e GNAQ/11. Vias adicionais como apoptose e CDK levam à progressão do ciclo celular, e podem ser ativadas por esses efetores a jusante das duas maiores vias. A montante de RAS e PI3K, o c-KIT, pode também ser mutado ou amplificado no melanoma

e, desta forma, ativar efetores a jusante das duas maiores vias. A via alternativa do receptor endotelial (ETR-endothelin receptor), envolvendo duas proteínas G- α heterotriméricas, GNAQ e GNA11, podem também ativar a via de BRAF/MEK/MAPK/ERK, elas desempenham um papel importante para o desenvolvimento de melanócitos normais e na formação do melanoma (PAPPA et al, 2015).

1.1.1.1. Modelo de Clark e mecanismos moleculares

O modelo de Clark da patogênese do melanoma (FIGURA 3) descreve diversos passos desde melanócitos normais até o aparecimento do melanoma, os quais incluem a formação do nevo e subsequentemente o desenvolvimento do nevo displásico, hiperplasia, invasão e metástase. Este modelo caracteriza as mudanças histológicas do melanoma maligno. Vários mecanismos moleculares, foram revelados posteriormente por métodos de genômica e proteômica e tem sido associados com o desenvolvimento do melanoma (MILLER, MARTIN; 2006). Apesar da progressão linear e gradual caracterize um subconjunto de melanomas, evidências significativas sugerem que, na maioria dos melanomas, a progressão é mais complexa e envolve muitos caminhos distintos, determinados por oncogenes distintos (DAMSKY et al, 2014) .

A visibilidade do nevo benigno é a primeira mudança fenotípica (CLARK et al 1984). As mutações em CDKN2A (inibidor específico da ciclina dependente de quinase) e em PTEN estão associadas com a formação de nevus displásicos. CDKN2A codifica as proteínas supressoras de tumor p16 e p14 que (KAMB et al 1994, CACHIA et al 2000). Já a perda de função do supressor tumoral PTEN leva a um acúmulo de PIP3 (fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato) e ativação de proteínas AKT, os quais levam à proliferação e sobrevivência do melanoma (WU et al 2003).

As mutações oncogênicas em NRAS e BRAF em conjunto com a perda de função de CDKN2A, p53 e PTEN levam o melanoma para a fase de crescimento radial (RGP-radial growth phase), a qual está também associada à altas concentrações de AKT ativa (STAHL et al 2004). O estágio seguinte de desenvolvimento do melanoma é a fase de crescimento vertical (VGP – vertical growth phase), que é caracterizada pela capacidade das células de melanoma de penetrarem a membrana basal, pela perda da adesão célula célula, transição epitélio mesênquima (EMT), perda de função de E-caderina e ganho de função de N-caderina (DANEN et al 1996, HSU et al 1996). A perda

de E-caderina da membrana leva à dissociação de β -catenina do complexo de adesão celular, a qual é translocada para o núcleo. O aumento no nível de β -catenina nuclear regula positivamente a expressão de Ciclina D1 e MITF, os quais estão associados com a proliferação, sobrevivência e invasão do melanoma (WIDLUND et al 2002, SHTUTMAN et al 1999). O aumento na expressão de BRAF V600E e PI3 quinase também caracterizam o estágio VGP. A via de PI3 kinase é uma via importantíssima no câncer e a ativação no melanoma está associada à ativação concorrente de RAS/RAF/MEK/ERK (DAVIES 2012).

Somente uma pequena proporção de nevus é responsável pela origem do melanoma. A progressão lenta de nevus para melanoma sugere que ocorrem mecanismos de supressão tumoral após a ativação de BRAF e outras mutações. A transformação dos nevus em melanoma ocorre normalmente na pele danificada pela exposição crônica ao sol (non-CSD – non-chronically sun damaged) em pacientes relativamente jovens. Muitos melanomas com mutação em BRAF não surgem a partir de nevus já existentes, sugerindo que tanto melanócitos com mutação em BRAF silenciados antecederam o melanoma, enquanto a mutação em BRAF foi adquirida tardiamente na melanomagenese levando a formação de um novo melanoma (DAMSKY, BOSENBERG 2017).

O tratamento de primeira linha do melanoma ainda é a excisão cirúrgica, quando diagnosticado em um tempo médio de 27 a 90 dias e ele ainda está no estágio III, ou seja, as células de melanoma já atingiram os linfonodos, quanto mais cedo a identificação do tumor (estágios I e II), melhor é o prognóstico. No estágio III os procedimentos realizados são, a excisão ampla do tumor como nos estágios menos avançados e a dissecação linfonodal. A terapia adjuvante com interferon pode ajudar a diminuir as chances de recidiva do tumor e, além deste recurso terapêutico outras drogas ou vacinas também podem ser utilizadas no tratamento, como quimioterapia, imunoterapia e terapia alvo dirigida.

A terapia e cura no estágio IV são muito mais difíceis, nesta fase as células já alcançaram os linfonodos ou outras áreas do corpo. A fim de melhores respostas e alcançar de fato a cura deste câncer, os tratamentos para melanoma metastático tem evoluído muito ao passar dos anos e, atualmente há várias opções de tratamentos tal como,

imunoterapia, radioterapia, terapias alvo-dirigidas, tratamentos combinatórios e quimioterapia. Apesar desses desafios, os avanços no tratamento tem melhorado os resultados de sobrevivência desses pacientes (GERSHENWALD et al, 2017).

FIGURA 3: Progressão do melanoma baseada no modelo de Clark. Em um primeiro momento a proliferação dos melanócitos normais é controlada dando origem ao nevo benigno. Os nevos displásicos/atípicos apresentam um crescimento anormal dos melanócitos do nevo pré-existente ou em um novo local resultando em uma lesão pré-maligna com atipia celular aleatória, caracterizados por máculas planas, maiores que 5 mm em tamanho, bordas irregulares e pigmentação variável. As células que adquirem a habilidade de proliferarem horizontalmente na epiderme estão na fase de crescimento radial, e histologicamente demonstram atipia (melanoma *in situ*), a E-caderina ajuda a manter essas células na epiderme, entretanto algumas podem invadir a camada papilar da derme. O aparecimento de outros eventos bioquímico, incluindo a perda de E-caderina e expressão de N-caderina permitem que essas células invadam a membrana basal e se proliferem verticalmente na derme, adquirindo um potencial metastático. O melanoma espalha então para outras áreas do corpo, geralmente invade primeiramente os linfonodos e posteriormente a pele, o tecido subcutâneo, pulmões e o cérebro. O crescimento radial dessas células.

Fonte: Adaptado de SEURADGE et al 2006.

1.1.1.2. Melanoma e células tronco

O modelo de Clark descrito anteriormente foi aceito por anos, onde a iniciação e desenvolvimento tumorais são atribuídos como um processo de vários passos que é acompanhado de transformações genéticas responsáveis pela transformação de células normais em células malignas.

O estudo de células tronco na medicina transformou-se desde a descoberta de auto-renovação de células no sistema hematopoiético (GIROUARD e MURPHY, 2011). As células embrionárias adultas possuem a habilidade de auto-renovação e produção de descendentes/progenia diferenciados de células que caracterizam um determinado órgão ou tecido (AMBLER e MAATA 2009; MADHURI e WICHA, 2007). As células-tronco podem ser divididas em quatro grandes grupos: embrionário, germinal, adulta ou somática, as células embrionárias (ESC-embryonic stem cells) se originam da camada interna da massa do blastocisto, são onipotentes e possuem indefinite replicative life span, que é atribuída a expressão de telomerase. As células tronco germinais são derivadas das camadas germinais do embrião. Elas se diferenciam em células progenitoras, a fim de produzir células de órgãos específicos. As células somáticas ou adultas são progenitoras de células e possuem menor replicative life span que as ESC, elas estão presentes nos tecidos maduros como hematopoiético, neural, gastrointestinal e mesenquimal (SAGAR et al, 2007).

O conceito de células tronco cancerígenas (CSCs – cancer stem cells) é baseado no fato de que essas células são biologicamente diferentes da maior parte da população celular tumoral e não tem capacidade de iniciação tumoral (OZLEM, 2009). As CSCs formam um subconjunto de células encontrado em malignidades que é responsável não somente pela formação do tumor, mas também por sua progressão severa (GIROUARD e MURPHY, 2011).

Os tumores consistem de uma população heterogênea de células que diferem na capacidade proliferativa, nos perfis histológicos e imunofenotípico, e no potencial tumorigênico. A hipótese do CSC propõe que a tumorigenicidade consiste em uma pequena subpopulação de células de câncer e que essas células, dessa forma, a iniciação, progressão, resposta a terapia e metástase, são resultado de mutações que podem tornar as células tronco somáticas normais em cancerosas, ou transformar as células de câncer em células do tipo tronco. A CSC mutada é então capaz de originar CSCs adicionais e uma variedade de células de cancer mais diferenciadas e funcionalmente diversas, muitas como células-tronco somáticas do tecido. (FIGURA 4) (RASTOGI, 2012).

As células tronco cancerígenas diferem de células tronco adultas, porque naquela a divisão resulta na iniciação e crescimento e tumoral, enquanto que células tronco normais se dividem e diferenciam em respostas a sinais fisiológicos para fornecer célula aos órgãos nos quais elas residem. Portanto, embora os dois tipos de células tronco coincidam, as células tronco adultas e cancerosas não são as mesmas (GIROUARD e MURPHY, 2011).

O número de evidências que suportam a teoria de células tronco cancerosas tem aumentado, entretanto alguns argumentos que a sustentam ainda estão nebulosos. Um tópico ainda debatido é a confusão com relação a definição de CSCs e sua relação com células-tronco. A definição de CSCs não implica que as CSCs se originam necessariamente de células-tronco. Embora alguns cânceres tenham surgido de transformação malignas de células tronco de tecidos adultos observados em alguns modelos, assumir que as CSCs devem ser originadas a partir de células-tronco é um equívoco (LEE, 2013).

A frequência de CSCs está relacionada com a progressão, potencial metastático e pior prognóstico em pacientes com melanoma. A identificação de uma subpopulação com células iniciadoras de melanoma maligno (MMIC – malignant-melanoma-initiating cells), caracterizadas pela expressão do mediador de quimiorresistência ABCB5, e utilização desta pequena população tumorigênica como alvo resultou em inibição do crescimento tumoral (SCHATTON et al, 2008). Além disso, um outro trabalho utilizou modelos *in vivo* para definir o papel de células-tronco de melanócitos (MCSCs – Melanocyte stem cells) como células de origem do melanoma, e o UVB pode agir como fator extrínseco que promove o processo de iniciação do melanoma através da ativação e translocação das MCSC, de maneira dose e inflamação dependente (MOON et al, 2017) .

As evidências concretas sobre a existência das MMICs apareceram com o reconhecimento do ABCB5 como marcador do progresso de melanoma, e sua frequência está correlacionada com a progressão da doença. A expressão de fator de crescimento nervoso (CD271 ou NGF – Nerve growth fator) também mostrou associação com a evolução do processo metastático e baixa sobrevida dos pacientes. As células tumorais circulantes (CTCs – circulating tumor cells) de melanoma ABCB4⁺ de pacientes

com melanoma metastático, demonstraram maior tumorigenicidade *in vivo*, quando comparadas às CTCs ABCB5⁻. As CTCs estão relacionadas com a progressão da metástase e foram encontrados elevados níveis de marcadores de MMIC. A presença de MMICs sugerem uma importante relação dessas células na promoção das metástases. Os estudos sobre a população de CSC pode levar a novas direções, ampliando os conhecimentos básicos sobre a metástase do melanoma e produzindo novos conhecimentos para desenvolvimento de terapias mais efetivas nos estágios mais avançados da doença. (LEE et al, 2014).

FIGURA 4: Modelos da tumorigenese estocástico versus de células-tronco cancerosas. De acordo com o modelo estocástico, cada célula do tumor tem a capacidade de se tornar tumorigênica. Em contraste, o modelo de células-tronco cancerosas defende que somente um subconjunto de células tumorais, conhecidas como células-tronco cancerosas, é tumorigênica, e que essas células são definidas por sua capacidade de auto renovação e plasticidade de diferenciação (Adaptado de GIROUARD e MURPHY, 2011).

1.1.1.3. Tratamentos

Em 2002, pesquisadores do Sanger Institute (Cambridge, UK) descobriram que mutações no gene que codifica a proteína serina-treonina kinase (BRAF) ocorria em cerca de 60% dos melanomas testados, essas mutações apareciam em menor frequência em outros cânceres, como tireóide e colon (DAVIES et al., 2002).

A dacarbazina foi identificada como padrão ouro no tratamento de melanoma em 1970 (LUCE, 1972) e atingiu sobrevida global de apenas 7,4 meses como agente único e uma taxa de resposta de 16,9% (HUNCHAREK et al., 2001). Alguns tratamentos combinatórios começaram a ser realizados para aperfeiçoar a monoterapia com dacarbazina, utilizando-se cisplatina, carmustina, a combinação dacarbazina e tamoxifeno apresentou maior taxa de resposta com relação ao tratamento único em uma fase III, o aumento não foi estatisticamente significativo (CHAPMAN et al., 1999).

As taxas de resposta com dacarbazina foram comparadas com imunoterapia, este tratamento surgiu a partir da característica imunogênica do melanoma que foi investigada ao observar que ele regredia espontaneamente quando associado à infiltração de linfócitos (TEFANY et al., 1991). A presença de vitiligo também já mostrou estar associada a um melhor prognóstico de pacientes com melanoma, provavelmente devido aos níveis de produção de IgG muito maiores em pacientes com melanoma e vitiligo (RAM et al., 2007, CUI et al 1995). A interleucina-2 (IL-2) é um fator de crescimento de linfócitos T e foi identificada em 1976, o tratamento de pacientes com melanoma metastático entre 1985 e 1993 induziu taxas de resposta de 16%, ou seja, maior que a dacarbazina. A IL-2 ainda induziu respostas duradouras, completas e em um número maior de pacientes metastáticos do que já era conhecido, entretanto, a sua alta toxicidade impediu seu uso (ATKINS et al., 1999, KOMENAKA et al. 2004).

O ipilimumabe é um agente imunoterápico, um anticorpo inibidor de CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4*), que é uma molécula expressa em linfócitos. O bloqueio deste receptor aumenta a resposta antitumoral de células T. Em um estudo de fase III comparou-se o tratamento de ipilimumabe, associado ou não à vacina peptídica glicoproteína 100 (gp100- antígeno do melanoma) em pacientes com

melanoma. A média de sobrevida global de pacientes que recebiam o ipilimumabe e a glicoproteína foi de 10,1 meses, muito maior do que aqueles que só recebiam a glicoproteína-100 que foi de 6,4 meses (HODI et al., 2010). A combinação Ipilimumabe e dacarbazina também foi realizada em pacientes com melanoma e a sobrevida global foi maior na combinação que no tratamento somente com dacarbazina. A combinação, entretanto, não foi aceita devido ao alto risco de hepatotoxicidade e ao aumento modesto da atividade clínica frente ao ipilimumabe sozinho (ROBERT et al., 2011).

Além do anti-CTLA4, outros importantes alvos terapêuticos para o checkpoint da resposta imune foram identificados, como PD-1, esta é uma proteína de checagem de células T e tem como objetivo impedir que células T ataquem células do corpo, quando ela se liga ao PD-L1 as células T deixam de atacar, alguns cânceres tem uma grande quantidade de PD-L1 que ajuda a evadir do sistema imune, o uso de anticorpos que bloqueia esta ligação pode aumentar a resposta imune contra células tumorais. O nivolumabe é um anti PD-1 aprovado em 2014 para o tratamento de pacientes com melanoma. (TOPALIAN et al., 2014). Em pacientes com melanoma avançado e câncer renal foram observadas respostas de 17-34% e media de resposta de 13-24 meses (TOPALIAN et al., 2014). Pembrolizumabe também tem como alvo a PD-1 e obteve taxas de resposta de 33% comparados a 12% do ipilimumabe (MINOR et al 2015). A combinação de ipilimumabe (anti-CTLA4) e nivolumabe levou a maiores taxas de resposta e maiores períodos de progressão livre de tumor quando comparados com a monoterapia (REDMAN, 2016). No Brasil o uso de ipilimumabe não é indicado para pacientes com melanoma disseminado e o anti PD-1 pembrolizumabe foi aprovado em 2016 para tratamento de câncer de pele do tipo carcinoma basocelular (Ministério da saúde, ANVISA)

O tratamento com imutérpicos levou a um grande avanço no tratamento de melanoma. Entretanto a identificação de mutações específicas, como a BRAF V600E, foi primordial para o desenvolvimento de inibidores que podem conter o desenvolvimento dessas células. O inibidor específico de BRAF V600E, Vemurafenibe, foi aprovado em 2011 pela FDA para o tratamento de melanoma metastático, mesmo ano de aprovação que o ipilimumabe. Primeiramente comparou-se o Vemurafenibe à Dacarbazina em pacientes que não foram previamente tratados, o tratamento com o inibidor de BRAF

aumentou a sobrevida global e progressão livre da doença, além da taxa de resposta ser 48,4% para o Vemurafenibe frente a 5,5% da Dacarbazina (KIM et al 2014). Com relação a outras mutações em BRAF, o Vemurafenibe mostrou atividade em 4% dos pacientes com tumores BRAF V600K (FLAHERTY et al 2010). No Brasil este medicamento foi aprovado em 2012 pela ANVISA para pacientes com melanoma metastático e portadores da mutação BRAF V600E (MENZIES et al 2012).

Os resultados alcançados pelo Vemurafenibe aumentaram as expectativas com relação ao tratamento com inibidores específicos, já que as taxas de resposta dos outros tratamentos vigentes eram muitos menores. Esses dados impulsionaram pesquisas a fim de obter respostas melhores e, em 2013 o Dabrafenibe foi aprovado para o tratamento de melanoma metastático ou irresssecável oriundo de mutação positiva do gene BRAFV600E pela FDA, e somente em 2016 foi aprovado no Brasil (ANVISA). Este inibidor demonstrou atividade em melanoma com mutações em BRAFV600E e BRAFV600K, além de ser a primeira droga a demonstrar atividade em metástase de melanoma cerebral (FALCHOOK et al 2012). O Vemurafenibe e Dabrafenibe possuem eficácia similares em melanoma metastático BRAFV600E (MENZIES et al 2012), entretanto enquanto aquele apresenta inibição similar com mutações em CRAF e BRAFV600E, o Vemurafenibe apresenta menor potência com relação a CRAF (BOLLAG et al 2010). Já com relação à mutação V600K o Dabrafenibe indicou maior potência de inibição (FALCHOOK et al 2012).

As respostas dos pacientes aos inibidores de BRAF são limitadas, com taxas de sobrevida livre da doença de cerca de 6 meses devido ao aparecimento de resistência (FIGURA 3) (ZEYNEP et al., 2016). Dois processos biológicos diferentes estão relacionados com a resistência de melanoma, (I) resistência intrínseca ou resposta tumoral adquirida, como a regulação positiva do receptor tirosina quinase e reativação de MAPK que está presente em 70% dos casos, ou (II) resistência adquirida tardiamente. Os principais mecanismos relacionados com este fenômeno são mutações concorrentes em RAS ou MEK, amplificação da forma mutante de BRAF e splicing alternativo (SHI et al 2009). A grande plasticidade das células de melanoma promove a evolução clonal das células de melanoma, emergindo fenótipos que superam a inibição de MAPK fenotipicamente e metabolicamente. Os desafios para tratamento dos pacientes

envolvem a superação da heterogeneidade entre paciente e no próprio indivíduo (ROESCH 2014, SHI et al., 2014).

Indivíduos desenvolvem mecanismos de resistência diversos e tumores de um mesmo paciente também podem desenvolver diferentes mecanismos de resistência, como mutações em NRAS (Q61R ou Q61K) em uma metástase e amplificações em BRAF ou mutações em MEK1 em outra (VAN ALLEN et al 2014, ROMANO et al 2013). Em um estudo conduzido por SHI et al 2012, 20% de todos os pacientes (9 de 40) desenvolveram pelo menos dois mecanismos diferentes de resistência.

FIGURA 5: Homem de 38 anos com melanoma BRAF mutado e metástase subcutânea, as fotos são (A) antes do tratamento com vemura.fenibe, (b) após 15 semanas de terapia com vemurafenibe e (c) após o aparecimento de resistência
Fonte: WAGLE et al., 2011.

O reaparecimento do melanoma após cerca de 6 meses de tratamento com inibidor de BRAF impulsionou o desenvolvimento de novas estratégias capazes de superar a resistência nessas células. Estudos pré clínicos sugeriram que a inibição de

BRAF e MEK poderiam reduzir o aparecimento de resistência, resultando em respostas mais duradouras e diminuição de toxicidade cutânea devido à ativação paradoxal de MAPK com a monoterapia do inibidor de BRAF (EROGLU and RIBAS 2016)

O Trametinibe é uma molécula inibidora seletivamente de MEK1 e MEK2 e foi aprovado pela FDA em 2013 como agente único para o tratamento de melanoma metastático ou irresssecável com mutações V600E ou V600K, e em 2014 para tratamento combinatório com Dabrafenibe (National Cancer institute). Em estudos de fases 1 e 2 mostrou evidências de regressão tumoral e estabilização da doença em pacientes que tiveram melanoma com mutação V600E e V600K (INFANTE et al 2010, KIM et al 2011). Assim como o trametinibe, o Cobimetinibe é um inibidor de MEK e em 2015 a FDA aprovou seu uso para tratamento combinatório com o Vemurafenibe de pacientes com melanoma metastático (National Cancer Institute).

O tratamento combinatório é uma abordagem para tentar aumentar o tempo de sobrevida desses pacientes, o Dabrafenibe e Trametinibe foram a primeira combinação de inibidores de BRAF e MEK em testes clínicos e levou a um aumento na sobrevida global dos pacientes, com taxas de resposta maiores, a combinação de Vemurafenibe com Cobimetinibe teve resultados semelhantes àqueles outros inibidores (DAUD et al., 2015). As combinações de inibidores de BRAF e MEK mostraram significativo aumento nas taxas de resposta, tempo de sobrevida livre da doença e sobrevida global, além de menos efeitos colaterais relacionados à ativação paradoxal de MAPK. Entretanto, apesar das taxas de resposta de até 70%, a duração dessas respostas é ainda de apenas um ano. Em vista disso, espera-se que estudos futuros forneçam informações sobre os perfis de pacientes que se adequariam mais à imunoterapia ou terapia com inibidores de BRAF/MEK (Figura 4) (EROGLU, 2016).

A terapia combinatória com nivolumabe e ipilimumabe aprovada pela FDA em 2016 mostrou eficácia em pacientes com melanoma em estágios avançados. Em um acompanhamento por mais de 33 meses em um estudo de fase 1 para determinação de dose, a combinação resultou em uma sobrevida média de 3 anos de 68% entre pacientes com melanoma independentemente de terem sido tratados anteriormente. Os dados de um estudo de fase 3 envolvendo pacientes que não foram tratados anteriormente para

melanoma, mostraram período mais longos de sobrevida livre da doença e maiores taxas de resposta com nivolumabe e ipilimumabe e com nivolumabe sozinho comparados ao ipilimumabe sozinho (WOLCHOK et al, 2017).

FIGURA 6: Tratamentos únicos e combinatórios aprovados pela FDA durante os anos, os inibidores específicos começaram a ser utilizados em 2011 com a aprovação do Vemurafenibe, um inibidor específico da mutação BRAF V600E, neste mesmo ano foi aprovado o anticorpo inibidor de CTLA4, Iplimumabe. Em 2013 foram aprovados o inibidor de MEK, Trametinibe, e o inibidor de BRAF V600E e V600K e de CRAF, Dabrafenibe. No ano seguinte foi realizada a primeira combinação de inibidores de MEK e BRAF, e dois outros agentes imunoterápicos anti-PD1 foram aprovados, Pembrozilumabe e Nivolumabe. A segunda combinação de inibidores de MEK e BRAF, Cobimetinibe e Vemurafenibe, foi aprovada em 2015. A aprovação da primeira combinação de imunoterápicos ocorreu em 2016.

Fonte: National Cancer Institute.

1.2. Matriz metaloproteinases e inibidores na progressão do melanoma

Uma das características do melanoma é sua alta capacidade de invasão e metastáse, e esta é a principal causa morte dos pacientes. A invasão celular e a metastáse representam processos complexos e ocorrem em diversas etapas, o papel de diversas matriz metaloproteinases (MMPs) são essenciais nesses processos (HOFMANN et al., 2000).

As MMPs são uma família de endopeptidases dependentes de zinco descritas pela primeira vez em 1962 (GROSS, 1962). Elas são primordiais em diversos processos

fisiológicos incluindo o remodelamento dos tecidos e desenvolvimento de órgãos (PAGE-MCCAW 2007), na regulação de processos inflamatórios (PARKS et al., 2004) e em doenças como câncer (EGEBLAD, 2002).

Na maioria das MMPs encontra-se uma estrutura geral com três domínios comuns, um peptídeo sinal que identifica as MMPs para secreção, um domínio propeptídeo (contém um resíduo de cisteína, Cys, conservado) e o domínio catalítico. Somente após a ruptura da interação entre a cisteína do pró domínio com o íon zinco do domínio catalítico que a enzima se torna proteoliticamente ativa (FIGURA 5) (KESSENBROCK et al., 2010).

FIGURA 7: Estruturas dependentes de subgrupos de matriz metaloproteinases (MMPs). (a) Domínios estruturais variados de MMPs. Todas as MMPs possuem um peptídeo sinal que

identifica as MMPs para secreção, um domínio propeptídeo (contém um resíduo de cisteína, Cys, conservado) e o domínio catalítico. As regiões que possuem diferenças com relação a família também são mostradas. (b) Subgrupos baseados nos domínios estruturais. A maioria das MMPs (com exceção da MMP-7, MMP-23A/B e MMP-26) contém um domínio hemopexina C-terminal e uma região flexível. Outros subgrupos das MMPs possuem características únicas como: domínio transmembrano, calda citoplasmática e tipo de membrana (MT – membrane type) loop (MT1-, MT2-, MT3- e MT5-MMP, também conhecidas como MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-24 respectivamente); a âncora do glicosilfosfatidilinositol (GPI – glycosylphosphatidylinositol) (MT4-MMP e MT6-MMP também conhecidas como MMP-17 e MMP-25 respectivamente); uma região de reconhecimento de furina (MT-MMPs e MMP-11, -21, -23A/B e -28), repetições de fibronectina do tipo II (MMP-2 e -9), e uma âncora do sinal N-Terminal, uma matriz de cisteína e um domínio do tipo Ig (MMP-23)

Fonte: Adaptado de LAFLEUR et al. 2003.

A atividade de MMPs é regulada de diferentes formas. Os genes de MMP são transcricionalmente responsivos a uma grande variedade de oncogenes, citocinas e hormônios (FINI et al., 1998) O processamento proteolítico é essencial para obtenção da enzima cataliticamente ativa, este processo pode ser obtido por várias proteinases que participam do processo de ativação do zimógeno precursor, como plasmina, furina e MMPs ativas (KNÄUPER et al., 1998).

FIGURA 8: Representação esquemática dos fatores que interferem na regulação da expressão gênica, ativação do zimógeno e inibidores endógenos;

Adaptado de GAFFNEY et al, 2015.

Durante o desenvolvimento tumoral as MMPs participam de pelo menos quatro etapas singulares do cancer, migração, invasão, metástase e angiogenese, todas características que dependem do microambiente e as MMPs degradam várias moléculas de adesão, modulando as interações célula-célula e célula-matriz extracelular (FIGURA 7) (GIALELI et al., 2011).

FIGURA 9: Modulação do microambiente tumoral por MMPs. Vários processos que são modulados por MMPs no microambiente tumoral. Os exemplos de MMPs da imagem promovem (pro) ou suprimem (anti) tais processos.

Fonte: Adaptado de KESSENBROCK et al., 2010.

O processo inicial de invasão tumoral tem como características a perda de adesão célula-célula e aumento na mobilidade celular (KALLURI et al., 2009). A superexpressão de diversas MMPs, incluindo MMP-3, MMP-7 e MMP-14 resulta na

formação de carcinoma (EGLEBAD et al., 2002). Durante este processo os tumores penetram nos vasos sanguíneos e linfáticos, para então disseminarem para outros órgãos. Para que isto ocorra, as células precisam cruzar barreiras físicas, como a membrana basal (KESSENBROCK et al 2010).

A MMP-3 foi encontrada em linhagens metastáticas mais agressivas e sua função invasiva foi atribuída à sua capacidade de ativar a forma latente de MMP-1 (BENBOW et al., 1999). A MMP-14 é uma metaloproteinase de membrana e é expressa principalmente na frente de invasão do melanoma (Kurschat et al., 2002). A inibição de MMP-14, utilizando um anticorpo seletivo bloqueou a proliferação celular e angiogênese em modelos *in vivo* (Devy et al., 2009). Além disso, as mutações em BRAF e NRAS regulam positivamente MMP-14 e induzem a invasão e crescimento de células de melanoma (Iida et al., 2004).

Durante o processo de invasão, os invadopódios utilizam proteinases como MMP-14 e MMPs secretadas e ativadas, como MMP-2 e MMP-9 para degradar uma variedade de moléculas da matriz extracelular. (WEAVER, M.A. 2006)

No melanoma a collagenase MMP-1 foi correlacionada com a fase de crescimento vertical junto com a MMP-13 (AIROLA et al., 1999). Já a expressão de MMP-1 em melanoma na fase de crescimento radial, levou a aumento no crescimento tumoral e viabilizou capacidade metastática *in vivo*. (Blackburn et al., 2009). Entretanto, não é toda metaloproteinase que apresenta características pró tumorais. Em modelos de carcinoma celular escamoso *in vivo*, MMP-8 mostrou características e funções anti-tumorais como supressor de metástase pela modulação da invasão e adesão celular (Balbin et al., 2003; Lopez-Otin et al., 2009). Esta metaloproteinase também foi associada a funções tumorigênicas, devido a sua presença em tumores primários vascularizados (Vihinen et al., 2008) e foi sugerido que a variação gênica de MMP-8 pode estar associada a um aumento no risco de melanoma maligno (Debniak et al., 2011).

As gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9) foram detectadas no estroma e em células de melanoma. Ensaios enzimáticos *in situ* mostraram que a atividade de MMP-2 em áreas periféricas tumorais são necessárias para degradar o colágeno do tipo I, clivar fibronectina e promover adesão e migração das células de melanoma (Jiao et al., 2012). A metaloproteinase -9 também foi descrita com características antitumorais pela

degradação de macromoléculas da matriz. A atividade enzimática de MMP-9 na membrana basal gera um fragmento proteolítico ativo, tumstatina, que suprime a atividade de células endoteliais e inibe a angiogênese (Hamano e Kalluri, 2005).

A inibição de MMPs pode ser realizada por inibidores endógenos, TIMPs, os quais apresentam especificidade por múltiplas enzimas e controlam diversas funcionalidades celulares e afetam não só processos nas células tumorais mas também em seu microambiente. Os quatro tipos de TIMPs são, TIMP-1 que inibe fracamente as MMPs de membrana, a TIMP-2 e TIMP-3 inibem todas MMPs, e a TIMP-4 inibe a maioria das MMPs. (JACKSON et al., 2016). As moléculas com estruturas de hidroxamato foram sintetizadas para obter funções similares às TIMPs, elas mostraram bons resultados em sistemas experimentais, mas falharam nos testes clínicos (OVERALL et al., 2006). Em um outro estudo o inibidor de MMP até promoveu a metástase. (MORENO-CÁCERES et al., 2014). Os estudos estão direcionados para o desenvolvimento de pequenas moléculas mais específicas e com diferentes grupos funcionais, bem como mecanismos baseados na ação de anticorpos (SELA-PASSWELL et al., 2011).

O perfil de MMPs em células de melanoma mostrou que o tratamento agudo com Vemurafenibe em uma linhagem com mutação BRAF V600E diminui as formas ativas de MMP-2, MMP-9 e MMP-14, sem modular os inibidores de MMP, TIMP-2 e RECK. Entretanto, em células de melanoma resistentes ao vemurafenibe há recuperação da expressão desta metaloproteinase (SANDRI et al 2016). Em células de glioma a expressão de MMP-2 demonstrou estar relacionada com o perfil invasivo das células (CORREA et al 2006), e em câncer cervical a expressão de MMP-2 por células do estroma está relacionada com o estágio clínico, quanto maior a progressão do tumor, maior a expressão da metaloproteinase (FERNANDES et al 2008).

1.2.1. Processos de ativação das metaloproteinases

1.2.1.1. Metaloproteinase 2 (MMP-2)

As MMPs identificadas como gelatinases desempenham um papel essencial na degradação de colágeno tipo IV e gelatina, os quais são os principais componentes da matrix extracelular. Dentre elas, destaca-se as MMP-2 e 9 e seus papéis importantíssimos no processo de invasão tumoral (ROOMI et al., 2009).

A metaloproteinase-2 é ativada por outras MMPs e proteases para obtenção das formas 68,58 e 54 kDa de MMP-2, este processo de ativação é regulado principalmente pelo complexo formado por TIMP-2 e MMP-14, FIGURA 10, o balanço entre essas espécies são fundamentais para a regulação dos níveis de MMP-2 (ROOMI et al., 2009; LEINONEN et al., 2008).

FIGURA 10: Desenho esquemático do processo de ativação da metaloproteinase -2 e o complexo formado pelo inibidor TIMP-2 e a matriz metaloproteinase 14 (MMP-14/ MTMMP-1). A proteína furin é a principal responsável pela ativação da MMP-14 que possui um domínio transmembrano e está ancorada nos domínios de degradação da matriz da membrana plasmática conhecido como invadopódio. Esta MMP ativa se liga ao TIMP-2, ancorados na membrana, e o complexo ativa a metaloproteinase 2 que degrad importantes moléculas da matriz extracelular. Fonte: Adaptado de MORLEY et al., 2007.

A metaloproteinase -2 está relacionada com a progressão e invasão tumoral e o aumento de sua expressão está relacionado com uma grande variedade de tumores. A expressão de MMP-2 é significativamente aumentada em melanoma primário (25%) e metastático (43%), comparado aos nevos normais (5%) e displásicos (10%). Os

pacientes com melanoma que apresentaram alta expressão de MMP-2 tiveram significativamente menor sobrevida que aqueles com expressão negativa a moderada de MMP-2 (ROTTE et al., 2012, KURSCHAT et al., 2002). Os níveis elevados de MMP-2 ainda foram encontrados em câncer de cólo, pâncreas, próstata e pele (BERUBÉ et al., 2005).

1.2.1.2. Metaloproteinase 9 (MMP-9)

A ativação da MMP-9 ocorre no meio extracelular pelo ativador do plasminogênio do tipo uroquinase e também pela MMP-2 (FIGURA11) (APPLEBY et al., 2017; RAMOS-DESIMONE et al., 1999).

FIGURA 11: Desenho esquemático de algumas formas de ativação da pro-MMP-9. A ativação do zimógeno pode ser realizada tanto pelo complexo ativador do plasminogênio do tipo uroquinase quanto também pela forma ativa de MMP-2.

Fonte: Adaptado de MICHALUK, P. et al 2007.

A MMP-9 desempenha um papel importantíssimo no remodelamento do tecido *in vivo* e aumenta o fenótipo invasivo de células de carcinoma de mama bem como a habilidade em degradar a matriz extracelular e passar pela membrana basal (RAMOS-DE-SIMONE et al., 1999).

Em melanoma humano primário, a MMP-9 foi exclusivamente expressa na fase de crescimento radial e não na fase vertical (VAAN DEN OORD et al., 1997). Em outra análise com 28 melanomas primários, 10 *in situ* e 18 invasivos, 6 melanomas *in situ* foram positivos tanto para MMP-2 quanto para MMP-9, enquanto que dentre os melanomas invasivos 14 foram positivos para MMP-2 e 13 para MMP-9 (SIMONETTI et al., 2002). A expressão constitutiva de MMP-9 também levou ao aumento da colonização de pulmões em modelos de metástase pulmonar, este processo foi suprimido em ratos deficientes de MMP-9. (MACDOUGALL et al., 1999). Em metástase de melanoma a MMP-9 teve marcação positiva para todos os casos (REDONDO et al., 2005) e é sugerido que a expressão de MMP-2 no tumor e estroma é essencial na progressão do melanoma primário, enquanto que a MMP-9 é essencial para a formação de metástases (HOFMANN et al., 2003).

1.2.1.3. Metaloproteinase 1 (MMP-1)

O aumento na expressão da metaloproteinase-1 (MMP-1) está associada com a incidência e invasão de vários tipos de câncer como, colorretal, esofágico, pancreático, gástrico, de mama e melanoma. A expressão elevada de MMP em tecidos de hiperlasia ductal atípica serve como marcador para predizer quais pacientes desenvolverão câncer de mama invasivo (LIU et al, 2012). Em um modelo de invasão com células de melanoma, a redução nos níveis de mRNA de MMP-1 resultaram na perda da habilidade dessas células de invadirem através de uma barreira compostas de colágeno do tipo I, de colágeno tipo IV e de membrana basal reconstituída (Matrigel), nesses experimentos a alta produção de MMP-2 não foi alterada (DURKOA et al, 1997). A MMP-1 também foi

correlacionada com menores tempos de sobrevida livre da doença, assim como a MMP-3, e ambas as enzimas e a MMP-13 foram associadas a maior produção de melanina por melanócitos nos pacientes estudados (NIKKOLA et al 2002).

A MMP-1 pode ser ativada pela degradação da fibrina, que é o maior substrato da matriz extracelular na angiogênese, mas também por estromelisininas (MMP-3 ou MMP-10) e a serina protease plasmina (FIGURA 12) (SAUNDERS et al, 2005)

FIGURA 12: Diagrama esquemático que ilustra a habilidade de várias serina proteases na ativação dos zimógenos de MMP-1 e MMP-10. A MMP-1 é ativada tanto pelas serina proteases diretamente, quando pela forma ativa de MMP-10, esses ativadores agem sinergicamente para super ativar a MMP-1, levando a degradação do colágeno do tipo I, regressão de tubos capilares, apoptose de células endoteliais (EC) e degradação da membrana basal. Adaptado de SAUNDERS et al, 2005.

1.2.1.4. Metaloproteinase de matriz associada à membrana - 14 (MMP-14/ MT MMP-1)

As metaloproteinases de matriz associadas à membrana (MT-MMP) são responsáveis pela ativação local do sistema enzimático (JABLONSKA-TRYPUĆ et al, 2016). A MT-MMP-1 (MMP-14) possui proteínas transmembranares e atividade colagenolítica em colágenos dos tipos I, II e III (VISSE e HIDEAKI, 2003), ela também cliva fibronectina, vitronectina, gelatina, laminina 1 e 5 e fibrina (PEI et al., 1996; Ohuchi et al., 1997), e é responsável pela ativação da MMP-2 e -13 (Kinoh et al., 1996). Ao contrário de MMPs que são secretadas, a MMP-14 é expressa na superfície celular em sua forma ativa (SATO et al, 2005). O domínio catalítico é ativado durante o transporte do compartimento de Golgi para a membrana plasmática pela remoção do propeptídeo pela furina. (FIGURA 13) (VAN HINSBERGH e KOOLWIJK, 2007).

FIGURA 13: Representação esquemática da ativação, atividade, e desaparecimento da metaloproteinase de matriz associada (MT1-MMP/ MMP-14) na superfície invasiva

(sprout). A MT1-MMP é ativada e exposta na superfície celular da vizinhança do *sprout* invasivo. Os passos descritos na parte superior da frente invasora da célula, na verdade estão concentradas na frente (adaptado de VAN HINSBERGH e KOOLWIJK, 2007).

Sprouting: transição entre os processos de vasculogênese e angiogênese, onde a perda da adesão celular constitui evento imprescindível para a formação de vasos secundários.

As células tumorais possuem um número elevado de isoformas de CD44, o complexo MMP-9 e receptores de CD44 em suas superfícies promove a degradação do colágeno do tipo IV. A ativação de MMP-9 com CD44 causa mudanças na invasividade do tumor e angiogênese, provavelmente pela ativação de TGF- β (controla proliferação, diferenciação celular, angiogênese, mobilidade, apoptose, entre outros). A MT1-MMP está envolvida na degradação de CD44 promovendo a migração celular (JABLONSKA-TRYPUC et al, 2016).

A MT1-MMP presente na superfície celular forma um dímero através dos domínios hemopexina e transmembranar. Uma das moléculas do dímero MT1-MMP é inibida pelo TIMP-2 que se liga ao sítio catalítico da MT1-MMP através do domínio N-terminal. A hemopexina da proMMP-2 forma um complexo ternário com o domínio exposto C-terminal de TIMP-2. A MT1-MMP não ligada ao TIMP-2 ativa a proMMP-2 clivando seu pre domínio que leva a ativação MMP-2 (ITOH, 2015).

A MMP14 é necessária para estágios mais avançados na metastáse, quando células de melanoma precisam invadir e colonizar os pulmões. Entretanto, o aumento desta protease ocorre assim que há transição do nevo para melanoma primário e continua aumentando durante o desenvolvimento (SHAVERDASHVILI et al., 2014).

1.2.1.5. Inibidor tecidual 2 de MMP (TIMP-2)

Inibidores teciduais de matriz metaloproteinases (TIMPs) são uma família de proteínas que agem como inibidores naturais de MMPs. Os membros da família de TIMP (TIMP-1, -2, -3 e -4) possuem similaridades entre si. Eles compartilham 40% de sua estrutura básica, as suas extremidades amino e carboxil contém seis resíduos de cisteína, as quais formam 3 ligações dissulfeto conservadas nas extremidades do N-terminal e C-

terminal da proteína. As TIMPs controlam processos celulares importantes como proliferação, apoptose e angiogênese por mecanismos independentes de sua atividade inibitória de MMP (REMILLARD et al 2014)

A TIMP-2 é o membro da família de inibidores mais expressa no estroma da maioria de tecidos adultos normais. Os níveis de expressão de TIMP-2 estão reduzidos em vários tipos de tumores e isto está relacionado com a maior agressividade do tumor. Os níveis de TIMP-2 em tecidos tumorais estão associados com redução do crescimento tumoral e aumento da sensibilidade à quimioterapia (STEVENSON-STETLER, W.G. e GAVIL, N.V., 2014). A superexpressão e redução de TIMP-2 foram observadas em mais de 30 estudos clínicos, incluindo tumores de mama, pulmões, gástrico, cólo e reto (JACKSON et al., 2017).

A superexpressão de TIMP-2 em modelos de melanoma na pele de rato imunodeficientes limitou o crescimento tumoral e angiogênese nos animais. Entretanto, clones que superexpressavam TIMP-2 ficaram mais resistentes à apoptose que as células parentais e os controles de células de melanoma, enquanto a necrose foi aumentada. Os dados confirmaram o papel de TIMP-2 na regulação negativa de metástase e angiogênese, mas indicou possível envolvimento na sobrevivência de células tumorais (VALENTE et al, 1998).

1.3. Curcumina e seus análogos

A curcumina é uma molécula simétrica, também conhecida por diferuloil metano, e possui fórmula química $C_{21}H_{20}O_6$ e peso molecular de 368,38. Em sua estrutura identifica-se três grupos: sistemas de dois anéis aromáticos que contêm grupos fenólicos o-metoxi, conectados por uma cadeia de sete carbonos ligados formando uma estrutura β -dicetona α,β –insaturada (PRIYADARSINI 2014).

O grupo diceto possui tautomerismo ceto-enol, que pode existir em diversos tipos de conformações dependentes do ambiente. Na maioria de solventes não polares e moderadamente polares a forma enólica é mais estável que a cetônica. Os isômeros cis-trans existem em solução, onde a forma trans, na qual os dois grupos fenólicos-metóxi

estão em posições opostas da estrutura da curcumina e é um pouco mais estável que a forma cis, na qual os grupos fenólicos –metóxi estão no mesmo lado (PRIYADARSINI 2014).

A curcumina é quase insolúvel em água e facilmente solúvel em solvents polares como DMSO, methanol, etanol, acetonitrile, clorofórmio, etil acetate, etc. Ela é relativamente solúvel em solventes hidrocarbonetos como ciclohexano e hexano. O espectro de absorção da curcumina possui duas bandas de absorção, uma na região do visível com pico máximo de 410 a 430 nm e outra banda na região do UV com pico máximo de 265 nm. Esta molécula é um ácido fraco de Brönsted, com três prótons fracos, e diferentes valores de pK_a s, o primeiro pK_a na escala de pH varia de 7,5 a 8,5 e há mudança de amarelo para vermelho (PRIYADARSINI 2014).

FIGURA 14 : Tautomerismo ceto enol e suas constantes de acidez, além de produtos da degradação da curcumina. O pK_a na escala de pH de 7,5 a 8,5 é quando ocorre a mudança de cor de amarelo para vermelho. A reatividade e solubilidade da curcumina aniônica, isto é, em pH básico aumenta a solubilidade em água quando comparada à forma neutra.

Adaptado de PRIYADARSINI 2014.

A curcumina é um tipo aceptor na adição de Michael, esta propriedade é frequentemente mencionada juntamente com a reatividade pleiotrópica com proteínas. A reação de Michael (FIGURA) é uma adição de um nucleófilo à sistemas de elétrons-

π , normalmente em cetonas ou ésteres α,β – insaturado (GRYNKIEWICS e SLIFIRSKI, 2012) .

FIGURA 15: Representação esquemática da reação de adição de Michael. Nucleófilos (como ânions OH, NH, SH e ácidos CH) são bons doadores. Compostos carbonílicos insaturados (como aldeídos conjugados, cetonas e ésteres) são bons aceptores (adaptado de GRYNKIEWICS e SLIFIRSKI, 2012).

Os PAINS, Pan-Assay Interference Compounds, são compostos que apresentam atividade em diversos testes biológicos, interferindo com a leitura de ensaios prejudicando os resultados das interações específicas do composto com o alvo. A curcumina possui todos os comportamentos de PAIN conhecidos: quelação de metais, reatividade redox, ruptura de membrana, interferência na fluorescência e decomposição estrutural. Esta molécula também possui características relacionadas com os IMPS, invalid metabolic panaceas, que tendem a esgotar os recursos de pesquisa. Os IMPS são protótipos de panaceias metabólicas improváveis e há duas observações sobre a curcumina que sugerem que pode ser classificada desta maneira: (1) a grande frequência com a qual a curcumina, ou misturas, é relatada como bioativa e (2) as altas razões de atividades positivas observadas em proporção ao número total de bioatividades reportadas, mais de 300 obtidas usando o banco de dados NAPRALERT (Banco de dados de química, atividade biológica, e uso cultural de produtos naturais desde 1975) (NELSON et al, 2017).

Culturalmente a curcumina o tumeric ou *Curcuma longa* (planta da qual a curcumina é extraída) é utilizado há séculos no tratamento de diversas doenças e é conhecido por propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e antimalárica. A curcumina é considerada farmacologicamente segura e é classificada segura para consumo humano pela agência federal do departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos

(FDA – Food and drug administration) e, seu consumo condimento, não está associado a efeitos colaterais. Estudos com esta molécula indicaram sua capacidade de bloquear a ativação de fatores ou enzimas de células humanas capazes de iniciar uma resposta anti-inflamatória, ela demonstrou hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). Com relação às atividades antitumorais, ela está associada à diversos processos como angiogênese, indução de apoptose, redução de níveis reguladores de ciclo celular, entre outros processos, em diferentes tipos de tumores, como leucemia, melanoma e carcinomas (PERRONE et al, 2015).

FIGURA 16: Efeito da curcumina em diversas vias de diferentes tipos de câncer

Adaptado de PANDA et al, 2017.

A baixa solubilidade da curcumina em água causa grandes problemas para administração oral, ela possui maior solubilidade em ambientes ácidos e, em ambientes neutros e básicos, ela é facilmente degradada. A baixa absorção, rápidas degradação e

metabolização são fatores importantes e favorecem a baixa absorção da curcumina. A fim de superar essas dificuldades na administração e absorção de curcumina, diversos sistemas de entrega da droga tem sido desenvolvidos, como incorporação em lipossomos, nanopartículas de polímero e microesferas, além da síntese de análogos a fim de maximizar determinadas atividades biológicas da curcumina e reduzir outras não favoráveis que limitam o uso clínico da molécula (PANDA et al, 2017).

1.3.1. Análogos da curcumina

A reatividade da curcumina e seu rápido metabolismo são características que tem influenciado diversos grupos de pesquisas a modificarem estruturalmente a molécula em busca de melhoramento da potência e atividade antitumoral. Na figura 17 é possível observar as regiões que são modificadas na curcumina.

FIGURA 17: Possibilidades de mudanças estruturais na curcumina: (A) aryl side chain modification, (B) Modificação na funcionalidade dicetonica, (C) Modificação das ligações duplas, (D) Modificação funcionalidade ativa metileno, (E) complexos metálicos da curcumina e (F) Análogos semelhantes estruturalmente.

Adaptado de VYAS et al, 2013.

Dentre as várias alterações na molécula de curcumina (FIGURA 18), focaremos nos análogos estruturais (F), FLL11, FLL12, GO-35 e, principalmente, o DM-1. A presença da carbonila α,β -insaturada na curcumina torna a região mais eletrofílica (aceptor de Michael), os análogos citados possuem como característica comum, a forma dicetônica/enólica da curcumina foi substituída por um grupo carbonilo. Dentre os análogos, aquele que apresenta maior similaridade com o DM-1 é o FLLL-11.

FIGURA 18: a molécula do DM-1 e três outros análogos monocarbonílicos da curcumina, FLLL11, FLLL12 e GO-035.

O GO-035 é um análogo que foi selecionado dentre 45 compostos, mas somente ele teve capacidade de inibir o crescimento de células de câncer do colon com valores de IC_{50} cerca de quatro vezes menores que a curcumina. No mesmo estudo foi demonstrado que modificação na cetona α,β – insaturada é importante na regulação do crescimento celular. Além disso, a modificação da curcumina para um diarilpentanona e a adição de grupos alcóxi aos anéis fenólicos foram as principais causas para um aumento da atividade supressora de crescimento da molécula (OHORI et al, 2006).

Os compostos FLLL11 e FLLL12 possuem estrutura diarilpentanona, mas os grupos funcionais adicionados aos anéis fenólicos são diferentes. Ambos os análogos foram mais eficazes que a curcumina ao inibir viabilidade celular, migração celular e formação de colônia em soft agar. Além disso eles possuem efeito sinérgico com a doxurrobicina para inibir o crescimento de células de câncer de mama. Quando comparados entre si, o FLLL12 é mais potente que a curcumina em regular

negativamente a fosforilação de AKT em células de câncer de mama e próstata. Diante dos resultados, o análogo FLLL12 é um agente melhor que o FLLL11 e a curcumina (LIN et al, 2009).

O DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxopenta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate, DM-1, and 3-oxopenta-1,4-dienyl-bis (2-methoxy-phenolate), é um análogo da curcumina sintetizado a partir do FLLL11 para obter sua forma hidrossolúvel, apesar de alguns dados terem sido gerados em DMSO (FAIÃO-FLORES et al, 2012), assim como neste trabalho. Utilizando um modelo de adenocarcinoma mamário (Ehrlich ascites tumors), os animais foram tratados somente com paclitaxel, somente DM-1 e a combinação paclitaxel+DM-1. O tratamento combinatório reduziu as áreas e volumes do tumor, e a frequência de metastases. Além disso, tanto a combinação quanto o DM-1 sozinho aumentaram os eventos de apoptose até 40%, o que é 35% mais que o tratamento somente com paclitaxel (FAIAO-FLORES et al, 2012).

Em um outro ensaio *in vivo*, porém em modelos de melanoma, foram utilizados a dacarbazina (DTIC) e o DM-1 (diluído em solução salina). O tratamento com DM-1 induziu significativamente apoptose, além de ter efeitos antiproliferativos na mesma linhagem celular. A DTIC causou morte por necrose, com uma pequena população que sofreu apoptose, além de induzir stress oxidativo e muitas mudanças fisiológicas em melanócitos. Já o DM-1 não afetou significativamente células normais (estes dados serão confrontados mais adiante com este trabalho), além de tanto o tratamento com DM-1 quando combinado com DTIC causou diminuição do tumor e aumentou a sobrevida (FAIÃO-FLORES et al, 2013a).

O tratamento com DM-1 (diluído em DMSO) em modelo *in vitro* de melanoma humano mostrou que a molécula causou desorganização dos filamentos de actina, redução da adesão focal e retração dos filopódios em células de melanoma SKMEL-5, levando à morte dessas células. O mecanismo de morte nas células SKMEL-5 ocorreu principalmente pela diminuição da razão Bcl-2/Bax, enquanto que em células A375 a apoptose foi induzida por Mcl-1 e Bcl-xL.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto foi caracterizar a estabilidade da molécula em diferentes solventes, avaliar o potencial citotóxico do composto DM-1 em células de melanoma sensíveis e resistentes ao inibidor de BRAF vemurafenibe, bem como em células saudáveis (melanócitos e fibroblastos). Além de avaliar o papel do DM-1 na modulação das matriz metaloproteinase-2, -9, -1, -14 e do inibidor tecidual 2 de metaloproteinases (TIMP-2), e seu papel na migração das células de melanoma, além de obter informações sobre o DM-1 na formação de tubos de células endoteliais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DM-1: 4-[5-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-oxo-penta-1,4-dienil]-2-metoxifenolato de sódio

Cedido por José Suarez Quincoces, UNIAN.

Patent US9381169

3.2. Análise por espectrometria de absorção do DM-1 em PBS e DMSO

O DM-1 foi diluído em soluções de DMSO (SIGMA®) e PBS 0,1 M pH 7,4 (Tampão fosfato salino) em uma concentração inicial de 1 mM e ficou sob agitação até sua completa dissolução. Após o preparo das soluções estoque, elas foram diluídas em concentrações de 240 μ M, 160 μ M e 80 μ M em seus respectivos solventes (Figura 10) e submetidas à varredura espectrofotométrica em um leitor de microplacas (Biotrek®) de 300 nm a 900 nm.

As soluções estoque também foram diluídas em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino 10 % a 240 μ M, 160 μ M e 80 μ M e submetidas a espectros de varredura de 300 nm a 900 nm.

FIGURA 19: Soluções de DM-1 240 μ M dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido), H₂O e PBS (Tampão fosfato salino) pH 7,4.

3.3. Manutenção de culturas celulares

As linhagens de melanoma foram cultivadas em meio DMEM (Dulbeccos's modified Eagle medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina), as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A troca do meio foi realizada a cada 2 dias e o repique sempre que as células atingiram confluência de 90%. Para as linhagens resistentes o meio foi suplementado com Vemurafenibe, 3 µM para linhagem SK-MEL-19 e 6 µM para SK-MEL-28, ambas linhagens possuem a mutação em BRAFV600E. Na figura 11 suas características morfológicas.

3.4. Obtenção das linhagens resistentes ao vemurafenibe

A geração de resistência nas células de melanoma foi realizada em um aumento gradativo na concentração de vemurafenibe, conforme esquematizado na Figura 12. Durante o processo de geração de resistência também foi observada aumento na produção de melanina por essas células, um dos mecanismos de resistência secundária é a amplificação de MITF, um fator de transcrição relacionado com a melanogênese e sobrevivência celular expresso exclusivamente em melanócitos (SPAGNOLO et al., 2014).

FIGURA 20: Desenho esquemático do processo de obtenção de linhagens celulares resistentes ao vemurafenibe. Acima observa-se que durante o processo há aumento na produção de

melanina pelas células, os perfis morfológicos da SKMEL 28 podem ser comparados antes e após a geração de resistência. Figura cedida por Fernanda Faião Flores .
Fonte: SANDRI, et al 2016.

3.5. Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular das linhagens de melanoma resistentes ao vemurafenibe (vemurafenibe) foi avaliada 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. Para a viabilidade de células cultivadas em monocamada, elas foram plaqueadas (1×10^4) em placas de 96 poços e, após atingirem 40-50% confluência foram incubadas com determinadas concentrações do composto DM-1 durante 24, 48 e 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 μ L DMSO/poço. A absorbância foi lida em leitor de microplaca a 570 nm. (DENIZOT, F. 1986)

3.6. Ensaios de viabilidade celular por ensaio de exclusão de Azul de Tripán – Definição de IC₅₀ do composto DM-1

Para determinação do IC₅₀ do composto DM-1, $1,0 \times 10^4$ células foram cultivadas em placas de 24 poços. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF, tratadas com diversas concentrações de vemurafenibe e DM-1 e incubadas por 24 e 48 horas. Após o tratamento, o meio foi coletado, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) e incubadas com tripsina- EDTA 0.1 %, as células foram então coletadas, centrifugadas e ressuspensas em volume de meio de cultivo e corante azul de *tripán* 0,8% na proporção de 1:1. As células foram então contadas manualmente em câmara de Neubauer considerando as células vivas e mortas. A viabilidade foi calculada como a razão entre o número total de células viáveis e o número total de células.

3.7. Análise de morte celular externalização de fosfatidilserina e análise de integridade da membrana celular.

A classificação de morte celular por necrose, apoptose ou apoptose tardia foi realizada a partir de experimentos com os marcadores Anexina e Iodeto de propídio, eles fornecem sinais de leitura em regiões diferentes do espectro eletromagnético e dependendo do sinal obtido pôde-se atribuir o tipo de morte celular predominante. A anexina faz parte de uma família de proteínas que se liga à forma aniônica de fosfolipídios sendo esta ligação dependente de cálcio, a fosfatidilserina está presente na parte interna da membrana celular e, quando em processo de apoptose, ela é externalizada e pode ser marcada com anexina. O iodeto de propídio se liga ao DNA, mas não possui a capacidade de penetrar a membrana das células saudáveis, portanto aquelas que marcam positivamente para este composto já estão com sua membrana comprometida. Quando há sinal detectado para os dois marcadores dizemos que a célula está em apoptose tardia. As linhagens foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro (10^4 células) e após sua adesão foi realizado o tratamento, o meio de cultura foi coletado, as células tripsinizadas e centrifugadas (3000 rpm durante 5 minutos), o *pellet* foi ressuspensionado em tampão fosfato-salino (PBS) e centrifugado, este processo foi repetido mais duas vezes e, por fim, o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de ligação (HEPES 0,1 M; NaCl 1,4 M; CaCl_2 25 mM), anexina e incubado durante 20 minutos, após este período foi adicionado iodeto de propídio (20 mg/mL). As células foram analisadas no aparelho BD FACSCanto II.

3.8. Análise de ciclo celular: fragmentação de DNA

O iodeto de propídio se liga às cadeias de DNA fornecendo sinais fluorescentes que podem ser captados e, dependendo da intensidade deste sinal, é possível avaliar fragmentação do DNA, o que possibilita a classificação das fases do ciclo celular que as células se encontram. O iodeto de propídio não é capaz de atravessar a membrana plasmática e, por isto, utiliza-se um tampão de lise para permitir sua penetração na célula.

Para caracterização das fases do ciclo celular, as células foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro ($\times 10^4$ células) e após sua adesão carenciou-se soro fetal bovino durante 24 horas, esta etapa é importante pois garante que todas as células fiquem paradas na fase G1 do ciclo celular. Em seguida as células foram tratadas com o IC₂₅, IC₅₀ e IC₇₅ do composto DM1, posteriormente o meio de cultura foi coletado, as células foram tripsinizadas após incubação com 1mL de tripsina á 37°C e centrifugadas á 3000 rpm durante 5 minutos, o *pellet* foi ressuscendido em PBS e centrifugado, este processo foi repetido mais duas vezes. Por fim, o *pellet* foi ressuscendido em 300 µL de tampão de lise (Citrato trisódico 0,10 %; Triton X-100 0,10 %) e RNase (1 mg/mL) e incubado durante 45 minutos a 37 °C, após este período foi adicionado iodeto de propídio (20 mg/mL). As células foram analisadas no aparelho BD FACSCanto II.

3.9. Ensaio Clonogênico

Foram plaqueadas 800 células por poço em placas de 6 poços (9,6 cm²) e de forma a garantir a baixa confluência, após 24 horas para adesão celular iniciou-se o tratamento com doses cinco vezes menores que o IC₂₅ conhecido e permitiu-se o crescimento até que o controle estivesse confluyente, as placas foram fixadas e coradas de acordo com FRANKEN, et al 2006.

3.10. Western blotting

3.10.1. Extração proteica

As linhagens celulares foram plaqueadas em placas de Petri de 60 mm de diâmetro. Quando as culturas atingiram aproximadamente 60% de confluência, as células foram tratadas com DM-1 por 48 horas. Após o tempo de tratamento, as culturas foram coletadas através de tripsinização, seguida de centrifugação. Adicionou-se ao pellet 70-100 µL de tampão de lise Laemmili (62,5 mM Tris-base pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%). A fração citoplasmática foi coletada e o material foi estocado a -80 °C.

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

As amostras foram normalizadas de acordo com a quantidade de proteína, utilizando-se o método de Bradford (1976), com o uso de Reagente de Bradford (Bio-Rad) e curva padrão de BSA (albumina sérica bovina). Em geral, utilizou-se 40 µg de proteína total para cada canal.

Utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida (30 acrilamida:1 bisacrilamida) de 10% a 15% para fracionamento das proteínas. Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF, utilizando O Transblot®. As membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio BSA, albumina, 3% à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora e incubadas overnight com o anticorpo de interesse, MMP-2 (abcam ab37150 diluição 1:1000 em albumina 3%) , MMP-9 (abcam ab19016 diluição 1:800 em albumina 3%), MMP-14 (abcam ab51074 diluição 1:2000 em albumina 3% e TIMP-2.(Cell Signaling D18B7 diluição 1:800 em albumina 3%) As membranas foram lavadas três vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário diluído em solução de bloqueio por uma hora à temperatura ambiente, com agitação. Após a incubação as membranas foram novamente lavadas três vezes em PBS e reveladas por quimioluminescência, utilizando o KIT ECL para detecção de proteínas (Amersham). As membranas foram expostas a filmes de raios-X por diferentes períodos de tempo.

3.11. Análise de expressão gênica através PCR em tempo real

3.11.1. Extração do RNA total

O ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído das linhagens de melanoma tratadas ou não com o composto DM-1 utilizando-se o Kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Germany), segundo instruções do fabricante. O RNA total, previamente aquecido a 65°C por 5 minutos, foi quantificado através do espectrofotômetro de luz UV a 260 nm e sua qualidade foi verificada pela relação A260/A280.

3.11.2. Transcrição reversa (RT-PCR) para síntese de cDNA

Para a reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), foi utilizado o kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (ThermoFisher Scientific). 1 µg de RNA total foi adicionado a 2 µL de RT Random primers, 2 µL de 10X RT Buffer, 0,8 µL de 25X dNTP 100 mM, 1 µL de Enzima Multiscribe e 4,2 µL de água livre de nuclease. Essa mistura foi incubada em equipamento termociclador a 25° C por 10 minutos, 37° C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e armazenado a 4° C.

As amostras de cDNA não foram quantificadas, visto que o produto da reação continha, além de cDNA, diversos dNTPs, que poderiam indicar um falso positivo na quantificação. Portanto, considerou-se que todo o RNA mensageiro contido no RNA total inicial foi convertido em cDNA. Para uso na placa de Real-Time PCR, o cDNA utilizado não foi diluído.

3.11.3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Para a reação de real time PCR foram utilizados primers dos genes de interesse MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-2 e o gene endógeno Beta-Actina, ambos da Taqman®. O ensaio de Real Time PCR foi realizado no aparelho Gene Amp 7500 Sequence Detection System v2.0.5 (PE - Applied Biosystems), localizado no Laboratório do Prof. Mário Hirata (Laboratório de Bioquímica Clínica, FCF – USP), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60°C por 1 minuto. Os dados foram analisados utilizando-se o método de quantificação comparativa ΔCT (expressão gênica relativa). Os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas com triplicata experimental. Como controle negativo foram utilizados poços sem amostra.

3.12. Ensaio de migração por ferida

As linhagens de melanoma SKMEL-28 e SKMEL-19 foram plaqueadas em uma placa de cultura de 24 poços na densidade de 2×10^6 células /poço em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de

estreptomicina), as linhagens SKMEL-19 e SKMEL-28 resistentes receberam Vemurafenibe (PLX) na concentração 3 μ M e 6 μ M respectivamente, adicionado ao meio. Após atingirem a confluência de 100% as feridas foram geradas utilizando uma pipeta de 200 μ L para riscar o meio de cada poço, lavou-se então 2 vezes com PBS para retirar os restos celulares soltos. As células foram incubadas a 37 °C por 24 horas com DM-1 (IC25 e metade da IC25) e os controles com meio DMEM suplementado com SFB com e sem vemurafenibe. As imagens foram acompanhadas em microscópio óptico Nikon Eclipse e as imagens foram analisadas pelo software Nis Elements até o fechamento das feridas. A migração das células durante o período de 24 horas foi analisada com o programa ImageJ (disponível em <http://imagej.nih.gov>). A migração celular foi calculada da seguinte forma: [(média da distância entre as feridas no tempo 0 h – média da distância entre as feridas no tempo final)/média da distância entre as feridas no tempo 0 h] $\times$ 100 (KOO et al., 2015).

3.13. Preparo do *coating* de colágeno

A presença de colágeno é responsável por um aumento na produção de diversas MMPs de matriz extracelular responsáveis pelo processo invasivo (TIAGO et al., 2014, QUAN et al., 2013)

O *coating* de colágeno foi preparado dentro de um fluxo laminar para evitar contaminações externas e em contato com gelo, para impedir a polimerização do precoce. Para o preparo foi utilizado colágeno tipo I de calda de rato comercializado Corning®, HAM F12, tampão de reconstituição 10X, soro fetal bovino e DMEM. Após coloca-los em Falcon estéril a solução foi gentilmente homogeneizada para evitar a formação de bolhas, esta solução foi aplicada em placas de cultura (1 mL para P100, 60,8 cm², e 600 μ L mL P60, 21,5 cm²) e espalhada gentilmente com o auxílio de uma ponteira de micropipeta, as placas ficaram à temperatura ambiente dentro do fluxo laminar por 30 minutos para total polimezação do colágeno. Após este período as células foram plaqueadas conforme as necessidades dos ensaios de Zimografia e quantificação por Biotrak activity assay (GE).

O coating de colágeno foi utilizado nos ensaios de quantificação das MMP -1, -2 e -9 e na Zimografia.

FIGURA 21: Perfis morfológicos das linhagens de melanoma SKMEL 19 e SKMEL 28 naive e resistentes em placa de cultura e sobre um *coating* de colágeno tipo I após 24 horas (aumento de 200X).

3.14. Determinação quantitativa das MMP-1, MMP-2 e MMP-9 - Biotrak Activity Assay

Para quantificação de MMP-1, MMP-2 e MMP-9, 10^4 células de melanoma foram plaqueadas em uma placa P60 (21 cm²) com *coating* de colágeno I e, após um dia para adesão das células (Figura 13), elas foram tratadas com DM-1 (5 µM) por 24 horas. Após este período, o sobrenadante foi coletado, centrifugado e quantificado pelo Reagente de Bradford (Bio-Rad) e utilizado no kit colorimétrico Biotrak MMP-2 Activity (Amersham, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA), Biotrak MMP-1 Activity (Amersham, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA) e Biotrak MMP-9 Activity (Amersham, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA). As microplacas foram preparadas conforme especificações do fabricante, e então tanto as amostras quanto os padrões do kit são incubados, todas as amostras foram ativadas com APMA (p-aminophenylmercuric acetate) (O resultado é referente às formas ativa e latente). Os sinais de absorbância das amostras devem ser quantificados utilizando a curva padrão. Os kits foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante e o ensaio foi realizado em triplicata.

3.15. Zimografia

3.15.1. Obtenção das proteínas coletadas no meio de cultura

Para o ensaio de zimografia, as linhagens SKMEL19 e SKMEL28 foram plaqueadas na presença e na ausência de matriz de colágeno tipo I. Após 24 horas, as células foram tratadas com várias concentrações de DM-1 e após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi retirado e centrifugado a 3000 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos a 4 °C, para não degradar as proteínas. As proteínas do meio de cultura foram normalizadas através do método Bradford.

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

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

3.15.3. Incubação e revelação do gel

Após a corrida, o gel foi lavado duas vezes por 15 minutos com 2,5% Triton X-100, para retirar o SDS. Em seguida, foi lavado 2X por 1 minuto cada com Tampão de incubação (0,05 M TrisHCl pH 8, 5 mM CaCl₂), à temperatura ambiente. O gel foi então incubado com esse mesmo tampão, *overnight*, à 37 °C, para a degradação do substrato pelas MMPs, para os controles adicionou-se 5 mM de EDTA a este tampão. O gel foi corado com 0,5% Coomassie brilliant blue R-250 por 30 minutos, à temperatura ambiente com agitação, e descorado com Solução Descolorante (Metanol 10%, ácido acético 10%). As bandas mais claras, que representavam a degradação, foram comparadas e analisadas conforme os objetivos tratados.

3.16. Ensaio de formação de tubos em células endoteliais

Para avaliar a capacidade do composto DM-1 de inibir a formação de novos vasos, células endoteliais t.END.1 foram plaqueadas em placas de 96 poços, contendo 50 µL de Matrigel e tratadas com de 5 µM e 10 µM de DM-1. Após 4 horas os tubos estavam formados no controle e então as fotos e quantificação foram realizadas tanto nos controles quanto nos tratamentos.

3.17. Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando análise de variância de dois fatores (two way ANOVA) seguido por

teste de Bonferroni utilizando o software GraphPad. Diferenças em um intervalo de 95 % ($P < 0,05$) de confiança foram consideradas significantes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estabilidade do DM-1 em solvente orgânico e aquoso

A solubilidade e estabilidade da curcumina e seus análogos tem sido o foco de muitos grupos de pesquisa, isto porque a baixa solubilidade e facilidade de degradação dessa molécula limitam seu uso. As formas e velocidades de degradação são dependentes diretamente das propriedades químicas do solvente utilizado (KUNNUMAKKARA et al 2008).

A curcumina existe nas formas enólica e dicetona, é estável em pH ácido, mas instável em pH neutro e básico (PAN et al, 1999). Quando a curcumina é analisada com relação aos diferentes pH do meio, constatou-se que em uma solução tampão fosfato salina 0,1 M com pH a 7,2 (condições fisiológicas) mais de 90% da curcumina é degradada. Entretanto, ao ser dissolvida em um tampão fosfato com pH 6,5 houve significativo aumento na estabilidade da curcumina (OETARI et al, 1995). O aumento na estabilidade desta molécula em um ambiente ácido é contribuída pela conjugação da estrutura dieno, enquanto que em um ambiente alcalino a molécula é desestruturada pela remoção do próton do grupo fenólico (WANG, Y et al, 1997).

Diante da grande importância em identificar a estabilidade de moléculas, realizamos ensaios com DM-1 dissolvido em DMSO e PBS (Tampão fosfato-salino pH 7,4) a fim de analisar o comportamento deste composto nos diferentes ambientes, já que em trabalhos já publicados ambos os solventes foram utilizados. (FAIÃO-FLORES et al 2013).

O DM-1 apresentou maior solubilidade em DMSO, porém encontramos grande dificuldade em preparar soluções a 10 mM em PBS e por isto, reduzimos a concentração da solução estoque para 1mM e, mesmo com esta concentração mais baixa, foi necessária agitação e aquecimento a 37 °C para total solubilização. O DM-1 apresentou em ambos os solventes pico máximo de absorção a 390 nm, que concorda com resultados anteriores, entretanto em PBS observamos também a presença de um pequeno pico a 350 nm (FIGURA 22-b), indicando a presença de outra espécie que é possivelmente sua forma conjugada e já identificada como o análogo FLLL11 (LEONARDO, 2002).

FIGURA22: Espectros de absorção do DM-1 em 0, 24 e 48 horas do composto dissolvido em (a) DMSO (b) e PBS.

O decaimento nas absorções de DM-1 a 390 nm ocorre de formas diferentes. Enquanto que em 24 horas decaiu aproximadamente 50% da absorbância máxima em PBS, em DMSO apenas 25%. Além disso, em 48 horas, a absorbância do DM-1 em PBS continuou decaindo, enquanto que em DMSO quase não ocorreu. Apesar de não terem sido realizados outros métodos analíticos, o fato do DMSO ser um solvente aprótico pode ter contribuído para que DM-1 não degradasse (FIGURA 23).

FIGURA 23: Comparação das absorbâncias a 390 nm em 24 e 48 horas das amostras de DM-1 preparadas em DMSO e PBS.

4.2. Estabilidade em meio de cultura

As amostras de DM-1 preparadas previamente em DMSO e PBS foram diluídas em meio de cultura a 240 μ M, 160 μ M e 80 μ M e submetidas a um espectro de varredura na região UV-Vis.

O composto DM-1 foi avaliado quanto ao seu comportamento em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (FIGURA 24). Em meio de cultura, o pico de maior absorção é em 485 nm e um leve pico

a 390 nm, o qual torna-se mais expressivo após 24 horas (FIGURA 24). A absorção em outro comprimento de onda indica que na presença de proteínas do soro o DM-1 comporta-se de forma diferente. Em estudos anteriores, a presença de albumina suprimiu a degradação da curcumina em $94,2 \pm 13,9\%$ (LEUNG et al 2009).

O pico que aparece a 390 nm pode indicar o DM-1 livre no meio, já que absorve o mesmo comprimento de onda quando comparado com as diluições em PBS e DMSO, e o pico a 485 nm provavelmente indica a molécula ligada às proteínas de soro, a qual fica livre gradativamente com o decorrer do tempo (FIGURA 24).

Figura 24: Espectros de absorção do DM-1 em meio de cultura suplementado com 10 % de soro fetal bovino de amostras previamente dissolvidas em tampão fosfato-salino (PBS) ou em DMSO.

As leituras foram realizadas em 0, 24 e 48 horas e em cada período foram utilizadas três concentrações diferentes de DM-1 (80, 160 e 240 μ M).

A solubilidade e estabilidade são dois dos grandes desafios para utilização da curcumina que interferem diretamente em sua biodisponibilidade. Uma das formas de tornar esta molécula mais estável é pela suplementação do meio com 10% de soro fetal bovino (WANG et al., 1997), isto porque a complexação da curcumina com a albumina diminui a velocidade de degradação (LEUNG, 2009).

Em nossos experimentos, o meio suplementado com soro fetal bovino aumentou a estabilidade do DM-1 quando comparamos com a molécula somente em PBS ou DMSO, provavelmente a ligação com as proteínas presentes no soro estabilizaram a molécula.

Estudos de farmacocinética *in vivo* sugeriram que o tempo de meia-vida do DM-1 é bem menor que o FLII-11. O DM-1 foi injetado endovenosamente nos animais e cinco minutos após a aplicação observou-se uma coloração amarela na urina, a qual intensificou-se nos cinco minutos seguintes. Os experimentos ainda indicaram a presença de DM-1 no fígado e coloração amarelada em porções do intestino em um período de 1-4 horas, sendo que 8 horas após a administração, os animais tratados estavam semelhantes aos controles com relação à farmacocinética. O trabalho ainda sugere que a diminuição da meia-vida se deve à forma de sal do DM-1 no plasma e rápida captação pelos tecidos, enquanto que o FLII-11 se manteria ligado por mais tempo nas proteínas plasmáticas. Este trabalho ainda afirma que o DM-1 é convertido em FLII-11 em contato com o plasma (LEONARDO, 2002).

Esses resultados indicam que o grande diferencial do DM-1 com relação ao FLII-11 é sua solubilidade em ambiente aquoso, que facilita a biodisponibilidade do composto. Entretanto, deve-se atentar que estudos minuciosos com relação aos padrões de degradação em diferentes solventes e principalmente uma comparação com curcumina e o DM-1 ainda não foram realizados com intuito de obtermos conclusões mais ricas sobre o composto.

Nossos dados indicam que o DM-1 possui maior estabilidade em DMSO quando comparado ao PBS com pH 7,4 e a presença de soro fetal bovino diminui as velocidades

de degradação da molécula. Entretanto, esses dados devem ser avaliados cuidadosamente, já que a ligação da molécula com as proteínas do plasma também podem interferir em sua distribuição nos tecidos.

4.3. Ensaio de citotoxicidade colorimétrico – MTT

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados primeiramente com o ensaio colorimétrico MTT. Diversas concentrações de DM-1 (100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,3 μ M, 3,1 μ M e 1,6 μ M) foram utilizadas em um período de 24 horas e após este período adicionou-se MTT por 3 horas, os cristais de Formazan foram dissolvidos em DMSO e quantificados em um espectrofotômetro. Os sinais de absorbância foram utilizados para estimar a porcentagem de células viáveis de acordo com o controle com DMSO. Os valores de IC₅₀ foram obtidos utilizando equações das curvas (*One Phase Decay*) que o programa *GraphPad Prism*® forneceu.

Neste ensaio fica claro que após 25 μ M o decaimento da viabilidade celular atinge um platô, exceto para a SKMEL 28 resistente ao vemurafenibe que não demonstra o mesmo comportamento. Os valores de IC₅₀ também são próximos para os três tipos de células, SKMEL 19 naive e resistente ao vemurafenibe e SKMEL 28 naive (Figura 25).

Em nossos ensaios triplicatas técnicas foram repetidas 7 vezes e observou-se grande variação nos valores de IC₅₀ obtidos. O DM-1 é um análogo da curcumina e preserva os anéis fenólicos que tem funções atribuídas às características antioxidantes, e que possivelmente interferiram no método. A coloração variável do DM-1, de vermelho a amarelo dependendo do pH, pode interferir na leitura das absorbâncias, já que o MTT é um método colorimétrico, levando a resultados que não representam a realidade. Além das características do DM-1 que podem ser um limitante para o uso do método, o MTT mede somente a atividade metabólica das células e para sabermos os efeitos citotóxicos outros ensaios são necessários. Em nossos experimentos seguimos com azul de Tripan e externalização de fosfatidilserina.

O ensaio de MTT tem sido considerado padrão ouro para ensaios de citotoxicidade devido a sua alta sensibilidade. Entretanto, vários estudos indicam que há interferência com diferentes compostos (TONDER et al., 2015). Ensaios como MTT tem interação com muito fitoquímicos que possuem potencial redutivo incluindo antioxidantes

e polifenóis (BRUGGISSER et al., 2002). A citotoxicidade da curcumina e seus análogos é analisada por MTT em grande parte dos trabalhos, entretanto, esta molécula possui características de agente redutor similar a muitos antioxidantes fenólicos, bem como muitos análogos a ela (TENNESEN et al., 1992; VYAS et al., 2013).

FIGURA 25: Viabilidade celular de 4 tipos celulares após exposição à diferentes concentrações de DM-1 avaliados por MTT. As curvas representam one phase decay e os valores foram obtidos utilizando a equação obtida pelo programa GraphPad Prism®.

4.4. Ensaio de viabilidade celular – Azul de Tripán

Como explicado anteriormente, os ensaios de Azul de Tripán foram realizados para obter de forma mais precisa os valores de IC_{50} do DM-1. Entretanto, não foi utilizado uma grande quantidade de concentrações de DM-1, diminuimos o limite máximo de concentração de acordo com os valores obtidos pelo teste colorimétrico MTT. Na FIGURA 26 podemos comparar os gráficos dos diferentes tipos celulares.

FIGURA 26: Viabilidade celular (%) obtidas por azul de tripan das células SKMEL 19 e 28 naive e resistentes após tratamento por 24 horas com quatro concentrações de DM-1,

Na Tabela 2 podemos comparar os valores de IC_{50} obtidos pelos diferentes métodos. A SKMEL 19 parental e SKMEL 28 resistente ao vemurafenibe foram as que sofreram maiores variações entre os dois métodos, quase 50 % quando a citotoxicidade fora obtida por Azul de Tripán.

TABELA 2: Comparação dos valores de IC_{50} obtidos por MTT e Azul de Tripan

Linhagens Celulares	IC_{50} (μM)	
	MTT	Azul de Tripan
SKMEL 19 parental	14,6	8,7
SKMEL 19 resistente ao vemurafenibe	18	14,4
SKMEL 28 parental	14,1	12,9
SKMEL 28 resistente ao vemurafenibe	43,6	23

Os testes de viabilidade utilizados representam diferentes formas de avaliação, o MTT avalia atividade mitocondrial e o azul de Tripan integridade de membrana celular, ambos nos dão uma noção dos reais valores de citotoxicidade celular. A fim de confirmar as concentrações obtidas por Azul de Tripan, realizamos uma análise por Citometria de Fluxo (FACS) com Anexina V e Iodeto de propídeo com intuito de analisar a externalização de fosfatidilserina e integridade da parede nuclear

4.5. Ensaio de externalização por fosfatidilserina

Como forma de analisar indiretamente o tipo de morte celular, bem como se há relação com os valores de IC_{50} obtidos anteriormente por azul de tripan. As células SKMEL 19 e 28 naive e resistentes ao vemurafenibe foram submetidas a um ensaio por externalização de fosfatidilserina, que é um indicativo do processo de morte por apoptose. Utilizamos a Anexina V, um composto que se liga a à fosfatidilserina de maneira dependente de cálcio e forma um cristal bidimensional ligado à membrana celular. e iodeto de propídeo que se liga às cadeias de DNA, mas não tem a capacidade de atravessar a membrana plasmática, a não ser que a célula tenha sofrido morte celular por necrose. Na FIGURA 27 estão representados os histogramas (A) e a quantificação (B) de acordo com cada fase do ciclo celular. Os sinais positivos para anexina indicam apoptose precoce, quando a anexina e o iodeto são positivos é indicativo de apoptose tardia e, somente o iodeto de propídeo indica morte por necrose.

FIGURA 27: (A) Histogramas representativos da SKMEL-19 naive e resistente ao vemurafenibe e SKMEL 28 naive e resistente ao vemurafenibe (identificadas na imagem como 19 N, 19 R, 28 N E 28 R respectivamente) do controle, tratamento com IC₅₀ e IC₇₅ marcadas com Anexina V (eixo y) e iodeto de propídio para quantificação dessas células. A distribuição (média+sd) é o número de células viáveis (AN-/IP-), em apoptose precoce (AN+/IP-), em apoptose tardia (AP+/IP+) e em necrose (AN-/IP+) em (B) SKMEL-19 naive, (C) SKMEL-19 resistente ao vemurafenibe, (C) SKMEL-28 naive e (D) SKMEL-28 resistente ao vemurafenibe. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pela 2 way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

O tratamento das células com a IC₅₀ e IC₇₅ como indicado na tabela 3, demonstra que o tratamento com IC₅₀ deixou cerca de 40 % das células sem marcação para anexina e iodeto de propídio, ou seja, causou cerca de 60% de morte nas linhagens SKMEL – 19 resistente e SKMEL – 28 naive e resistente, na SKMEL-19 naive causou cerca de 70% de morte. O tratamento com IC₇₅ induziu cerca de 70% de morte para SKMEL-28 naive e resistente, e 78% e 65% para as linhagens SKMEL-19 naive e SKMEL-19 resistente, respectivamente. Em todos esses casos, o DM-1 induziu majoritariamente morte por apoptose.

Tabela 3: Porcentagem de células viáveis após o tratamento com IC₅₀ e IC₇₅

Tratamento	IC ₅₀	Valores de IC ₅₀ (μ M)	IC ₇₅	Valores de IC ₇₅ (μ M)
Porcentagem de células viáveis	%		%	
SKMEL 19 naive	27	8,7	22	14
SKMEL 19 resistente ao vemurafenibe	41	14,4	35	23
SKMEL 28 naive	39	12,9	29	22
SKMEL 28 resistente ao vemurafenibe	40	23	32	32

A análise por FACS mostrou que os valores de IC₅₀ encontrados por azul de Tripán são capazes de induzir cerca de 60% de morte, principalmente por apoptose (FIGURA 27). A citotoxicidade de DM-1 não demonstrou ser específica para algum tipo celular, sendo citotóxico a concentrações semelhantes nos diferentes tipos celulares, esta característica pode ser um indício que o DM-1 age de formas semelhantes tanto em linhagens naive quanto resistentes ao vemurafenibe.

4.6. Seletividade

A fim de saber se o DM-1 é seletivo em células normais da pele, realizamos contagem por azul de Tripán em um período de 24 horas de tratamento. As mudanças morfológicas podem ser observadas na FIGURA 28.

(A)

(B)

FIGURA 28: Mudanças morfológicas em (a) fibroblastos e (b) melanócitos após o tratamento por 24 horas com DM-1.

A partir de 10 μM é possível observar a retração dos fibroblastos e modificação na morfologia que indicam processo de morte celular. Já nos melanócitos este processo já é observado a 1,5 μM . Na tabela 4 estão descritos os valores de IC_{50} para melanócitos, fibroblastos e os diferentes tipos de melanoma. Esses valores deixam claro a ausência de seletividade do DM-1.

TABELA 4: Valores de IC_{50} (μM) obtidos em 24 horas para diferentes tipos celulares.

Linhagens celulares	IC_{50} (μM) em 24 horas
Melanócitos	1.7
Fibroblastos	14
SK-MEL 28 naïve	18
SK-MEL 28 resistente ao vemurafenibe	20
SK-MEL 19 naïve	20
SK-MEL 19 resistente ao vemurafenibe	17

Diversos ensaios sobre a seletividade da curcumina e seus análogos tem sido realizados, já que está é um característica desejável quando avaliamos moléculas com potencial antitumoral. A curcumina já mostrou ser citotóxica para células de melanoma, A375, MV3 e M14, induzindo inibição de crescimento tempo e dose dependente, com IC_{50} para 48 horas de 8,29 μM , 18,29 μM e 14,25 μM respectivamente. Não foi observada significativa inibição de crescimento em fibroblastos humano, MRC-5, de 5 μM a 30 μM sob as mesmas condições. Neste estudo, a curcumina pode inibir o crescimento de células de melanoma de forma seletiva, sem afetar células normais (JIANG et al., 2015). uniformemente (50%) após 48 horas de tratamento. (BILL et al., 2009).

O DM-1 apresenta uma estrutura molecular muito similar com o análogo FLLL11, a única diferença entre eles é que o primeiro é um sal fenólico como pode ser verificado na figura 8 e, conseqüentemente, possui melhor solubilidade em ambiente aquoso. O

tratamento por 72 horas com cinco diferentes linhagens de células de câncer pancreático mostrou que FLLL11 inibiu a viabilidade dessas células melhor que a curcumina com IC_{50} entre 0,28 μM e 3,28 μM , enquanto que as concentrações para a curcumina estavam entre 8,67 μM e 20,35 μM . Frente a células não malignas imortalizadas (HPDE) o análogo FLLL11 tem IC_{50} 0,44 μM , enquanto que em células normais da bexiga o valor é 206,41 μM .

Apesar da citotoxicidade em células tumorais demonstrada pela curcumina e seus análogos, especialmente com estrutura monocetônica, essas moléculas muitas vezes não apresentam seletividade. A curcumina já demonstrou citotoxicidade à linfócitos humanos (KUTTAN et al., 1985) e macrófagos murino e células dos rins humanas, com valores de IC_{50} de 31 μM e 15,2 μM respectivamente (GLASER, J. et al 2016).

Os ensaios realizados com o análogo da curcumina DM-1 indicaram que este composto possui atividade antitumoral em 4 linhagens de melanoma, onde duas apresentam resistência ao vemurafenibe. Entretanto, este composto não demonstrou seletividade em nossos estudos.

4.7. Ensaio clonogênico

Nós realizamos testes com concentrações de IC_{25} para 48 horas e as colônias foram totalmente inibidas, entretanto ao utilizarmos um quinto do valor de IC_{25} ($0,2IC_{25}$) não houve diferença entre o controle e o tratamento. Com o propósito de encontrar um valor intermediário, onde fosse possível observar redução parcial no número de colônias utilizamos 0,8 μM (que corresponde a aproximadamente metade da IC_{25} das linhagens) (FIGURA 29).

FIGURA 29: Ensaio clonogênico com as linhagens SKMEL 19 naive e resistente ao vemurafenibe e SKMEL 28 naive e resistente ao vemurafenibe, (A) As colônias formadas pelas diferentes linhagens celulares podem ser observadas nos controles, a SKMEL 28 resistente ao vemurafenibe forma colônias maiores que os outros tipos celulares. O tratamento com 0,8 µM de DM-1 reduziu parcialmente o número de colônias enquanto que a inibição completa foi observada com 1,6 µM. (B) O número de colônias foi obtido pelo programa IMAGE J e os tratamentos foram calculados com relação ao controle. Em todas as linhagens celulares há diminuição significativa em seu número, entretanto, destaca-se que o tratamento com 0,8 µM reduziu a 50% as colônias da SKMEL 28 resistente ao vemurafenibe. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pela 2 way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$., as quantificações foram realizadas com o programa IMAGE J.

As células de câncer necessitam de divisão ilimitada para conseguirem crescer e formar tumores macroscópicos, este comportamento contrasta com aquele da maioria das linhagens celulares do corpo humano, as quais possuem um número limitado de sucessivos ciclos de divisão e crescimento celular (HANAHAHAN et al., 2011).

O DM-1 inibiu a capacidade replicativa das células de melanoma impedindo-as de formarem colônias como observado nas figuras e gráficos (FIGURA 29- a e -b), em concentrações maiores a inibição foi total. A inibição na formação de colônias é um fenômeno que já foi observado com a curcumina em células de carcinoma na vesícula biliar, o qual ocorreu de maneira dose dependente (LIU et al., 2013) e em células de câncer de próstata (CHENDIL et al., 2004). O análogo monocarbonílico, A 501, e curcumina foram utilizados em ensaios com células de câncer de pulmão e ambos inibiram a formação de colônias, entretanto o análogo demonstrou neste ensaio maior capacidade inibitória que a curcumina (XIA et al., 2014). O GO-Y030 também demonstrou maior capacidade inibitória na formação de colônias independentes de ancoragem em células de câncer de mama e pancreático (HUTZEN et al., 2009).

4.8. Ensaio de ciclo celular

O ciclo celular é um processo organizado nas seguintes fases que levam à morte e divisão celular. Fase G1 na qual a célula cresce e os cromossomos se preparam para replicarem, fase S, o DNA é replicado e os cromossomos duplicam. Fase G2 que representa o gap entre a síntese de DNA e mitose. Fase M (mitose), onde ocorre a divisão nuclear e citoplasmática, gerando duas células filhas. A desregulação deste processo é uma característica fundamental na progressão tumoral, portanto drogas que causam parada do ciclo celular são uma abordagem importante no tratamento do câncer (LEBE et al, 2007). Com objetivo de avaliar se o DM-1 produz tal efeito nas células de melanoma tanto naive quanto resistentes, realizamos o experimento de ciclo celular e obtivemos os resultados apresentados na FIGURA 30.

A

SKMEL 19 N

SKMEL 19 R

SKMEL 28 N

SKMEL 28 R

Células (%)

FIGURA 30: (A) Histogramas representativos da SKMEL-19 naive e resistente ao vemurafenibe e SKMEL 28 naive e resistente ao vemurafenibe (identificadas na imagem como 19 N, 19 R, 28 N e 28 R respectivamente) do controle e tratamento com 2 μ M de DM-1, e marcadas com iodeto de propídio após serem sincronizadas por 24 horas na ausência de soro fetal bovino para quantificação dessas células. A distribuição (média+sd) é a porcentagem de células em cada uma das fases (B) SKMEL-19 naive, (C) SKMEL-19 resistente ao vemurafenibe, (C) SKMEL-28 naive e (D) SKMEL-28 resistente ao vemurafenibe. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pela 2 way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Em doses subtóxicas, IC_{25} , o DM-1 induziu parada de ciclo celular em G1/G0 de maneira significativa para a linhagem SKMEL-28 naive, enquanto que para as outras linhagens não foi observada parada em G1/G0 significativas (FIGURA 30). Estudos anteriores já demonstraram que o DM-1 induz parada de ciclo em G1/G0 em células de melanoma murino, B16F10, e melanoma humano A375 (FAIÃO-FLORES et al, 2012, FAIÃO-FLORES et al, 2013).

A parada de ciclo em G1/G0 também foi observada no uso de curcumina e uma mistura de curcuminóides em células de leucemia após tratamento por 12 e 24 horas. Entretanto em 48 horas não observou-se diferença com relação ao controle devido à baixa estabilidade da curcumina (TIMA et al., 2014).

O análogo da curcumina, A501 induziu parada de ciclo celular em G2/M em células de câncer de pulmão e suas propriedades inibitórias de proliferação estão associadas à pronunciada parada de ciclo (XIA et al., 2014). O EF24 também induziu parada de ciclo na fase G2/M de maneira dose dependente em células de câncer do colon e reto (HE et al., 2016) e tempo dependente em carcinoma de ovário sensível e resistente à cisplatina (SELVENDIRAN et al., 2007).

4.9. Metaloproteinase de matriz e inibidores na progressão do melanoma

4.9.1. Metaloproteinase-1 (MMP-1)

A capacidade das células tumorais invadirem outras camadas da pele e outros tecidos, levando à metástase, é responsável pelo pior prognóstico de pacientes, e as metaloproteinases desempenham um papel importante e complexo neste processo (NIKKOLA et al., 2005; AIROLA et al., 1999).

Com intuito de compreender qual o papel do DM-1 na modulação de metaloproteinases importantes no processo invasivo, realizamos ensaios de Real Time PCR para expressão de mRNA, Western Blot para expressão de proteínas, quantificação de metaloproteinases no meio extracelular por BIOTRAK e zimografia para atividade dessas enzimas.

Utilizamos o kit *MMP-1 Biotrak Activity Assay* para determinar a quantidade de MMP-1 no sobrenadante das células plaqueadas em *coating* de colágeno tipo I e tratadas com DM-1. A presença de colágeno no microambiente induz a produção de metaloproteinases, dentre elas, a MMP-1 que está intimamente ligada com o processo de invasão e metástase.

FIGURA_31: Concentração da MMP-1 no sobrenadante das células SKMEL-19 naïve e resistente e SKMEL-28 naïve e resistente (identificadas como SKMEL-19 N, SKMEL-19 R, SKMEL-28 N e SKMEL-28 R respectivamente) cultivadas em *coating* de colágeno. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por two way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O tratamento das linhagens de melanoma com DM-1 reduziu significativamente MMP-1 na SKMEL-28 resistente ao vemurafenibe (FIGURA 31). A concentração inicial de MMP-1 nesta linhagem é a maior dentre as outras analisadas e, após o tratamento, ela foi reduzida a pelo menos 50%, que corresponde aos mesmos níveis de MMP-1 na linhagem SKMEL-28 naïve.

4.9.2. Metaloproteínase – 2 (MMP-2)

4.9.2.1. Análise do sobrenadante de células cultivadas em placa de cultura

A metaloproteínase-2 está relacionada com a progressão e invasão tumoral de uma grande variedade de tumores e a fim analisarmos o papel do DM-1 na modulação desta endopeptidase, realizamos ensaios de PCR e Western Blot.

As células de melanoma foram cultivadas em placas de cultura (sem *coating* de colágeno) e tratadas com DM-1 (5 μ M) por 24 horas, após este período o mRNA e lisados celulares foram extraídos, conforme protocolos descritos em materiais e métodos, e analisados.

FIGURA 32: As linhagens SKMEL-19 naïve e resistente ao vemurafenibe e SKMEL-28 naïve e resistente ao vemurafenibe (identificadas na imagem como 19 N, 19 R, 28 N E 28 R respectivamente) foram tratadas com 5 μ M e 8 μ M de DM-1 e analisadas. (A) expressão do mRNA de MMP-2 foi reduzida para a SKMEL-19 naïve, (B) os dados de expressão proteica sugerem que há um aumento na quantidade de MMP-2 intracelular, mas não há dados suficientes para análise estatística nos dados de Western Blot e (C) expressão proteicas de MMP-2 e do controle endógeno (vinculina) para quantificação das bandas. Os dados de mRNA foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por two way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O tratamento com DM-1 modulou o mRNA negativamente somente para SKMEL-19 naïve, nas outras linhagens não teve mudança significativa (FIGURA 32-A), por outro lado nos dados obtidos por Western Blot (FIGURA 32- B e -C) o tratamento

com 5 μ M de DM-1 elevou a expressão de MMP-2 para SKMEL-19 e -28 naive e SKMEL-19 resistente .

4.9.2.2. Análise do sobrenadante de células cultivadas em *coating* de colágeno

Os ensaios de zimografia e BIOTRAK foram realizados a partir do sobrenadante de células cultivadas em *coating* de colágeno, o qual estimula a produção da endopeptidase. O controle positivo utilizado na zimografia foi sobrenadante de pele reconstruída, já que neste sistema a expressão é mais alta.

A concentração total de MMP-2 (pró-forma e ativa) no meio extracelular foi obtida por BIOTRAK (FIGURA 33 –A) e a atividade desta endopeptidase foi obtida por zimografia (FIGURA 33-B).

FIGURA 33: Quantificação de MMP-2 no sobrenadante das células SKMEL-19 naive e resistente ao vemurafenibe e SKMEL-28 naive e resistente ao vemurafenibe (identificadas na imagem como 19 N, 19 R, 28 N E 28 R respectivamente) cultivadas em *coating* de colágeno.(A) análise por BIOTRAK e os resultados correspondem às formas ativas e a pró-forma da MMP-2, (B) quantificação da atividade de MMP-2 e (B) géis de zimografia utilizados no experimento, controle é a linhagem tratada só com veículo, 5 μ M de DM-1 e, para o controle positivo, foi utilizado

sobrenadante de pele reconstruída *in vitro*. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por two way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A concentração de MMP-2 extracelular foi reduzida para SKMEL-19 resistente ao vemurafenibe, SKMEL-28 naive e SKMEL-28 resistente ao vemurafenibe e, dentre essas linhagens, a SKMEL-28 resistente ao vemurafenibe é a que apresentou maior concentração quando não tratada e, após o tratamento, ela foi reduzida a menos de 25% da concentração inicial, nível da SKMEL-28 naive. Este comportamento também foi observado na MMP-1 nessa mesma linhagem. A relação entre MMP-2 e células de melanoma resistentes ao vemurafenibe já foi descrita anteriormente. A expressão de MMP-2 é maior em células resistentes quando comparadas às células naive, e isto está associado com o aumento da capacidade de invasão (SANDRI et al, 2016).

Quando comparamos os dados de BIOTRAK (FIGURA 33 –A) com a ziomografia (FIGURA 33-B), somente as linhagens SKMEL-19 resistente ao vemurafenibe e SKMEL-28 naive concordam na modulação negativa após o tratamento com o DM-1.

4.9.3. Metaloproteinase-9 (MMP-9)

4.9.3.1. Análise do sobrenadante de células cultivadas em placa de cultura

A metaloproteinase-9 é uma collagenase do tipo IV e, assim como a MMP-2, precisa ser ativada no meio extracelular, ela também está relacionada a progressão do melanoma e metástases (REDONDO et al., 2005; HOFMANN et al., 2003).

FIGURA 34: As linhagens SKMEL-19 naïve e resistente ao vemurafenibe e SKMEL-28 naïve e resistente ao vemurafenibe (identificadas na imagem como 19 N, 19 R, 28 N e 28 R respectivamente) foram tratadas com 5 μ M e 8 μ M de DM-1 e analisadas. (A) Expressão do mRNA de MMP-9, (B) Expressão proteica de MMP-9, realizado em duplicata e (C) Expressão de MMP-9 nos dois tipos celulares, a vinculina foi utilizada como controle endógeno. Os dados de mRNA foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por two way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O tratamento das células de melanoma com DM-1 modulou positivamente os níveis de mRNA de MMP-9 para SKMEL-19 naïve e SKMEL-28 resistente ao vemurafenibe, para as outras linhagens não houve mudança significativa. A expressão de mRNA para SKMEL-19 naïve mostrou comportamento oposto quando comparamos com os resultados de MMP-2 (FIGURA 33-A).

A quantificação dos lisados proteicos para SKMEL-28 naïve e SKMEL-19 resistente ao vemurafenibe (34-B) não indica diferença na expressão da MMP-9 após tratamento.

4.9.3.2. Análise do sobrenadante de células cultivadas no *coating* de colágeno

Os ensaios de zimografia e BIOTRAK foram realizados com os sobrenadantes das células cultivadas em *coating* de colágeno.

FIGURA 35: Quantificação de MMP-9 no sobrenadante das células SKMEL-19 naive e resistente ao vemurafenibe e SKMEL-28 naive e resistente ao vemurafenibe (identificadas na imagem como 19 N, 19 R, 28 N E 28 R respectivamente) cultivadas em *coating* de colágeno. (A) análise por BIOTRAK e os resultados correspondem às formas ativas e a pró-forma da MMP-9, (B) quantificação da atividade de MMP-2 e (C) géis de zimografia utilizados no experimento, controle é a linhagem tratada só com veículo (DMSO), tratamento com 5 μ M de DM-1 e, para o controle positivo, foi utilizado sobrenadante de pele reconstruída *in vitro*. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por two way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O tratamento com DM-1 diminuiu significativamente a concentração de MMP-9 nas linhagens SKMEL-19 e SKMEL-28 resistentes ao vemurafenibe (FIGURA 35-A), aquela ainda apresentou a maior concentração de MMP-9 comparada às outras linhagens e, após exposição ao DM-1 a endopeptidase foi reduzida a menos de 25% da

concentração inicial. A atividade da endopeptidase diminuiu significativamente para as linhagens SKMEL-19 resistente ao vemurafenibe e SKMEL-28 naive, entretanto o efeito oposto é observado para a SKMEL-19 naive (FIGURA 35- B).

A redução da atividade de MMP-9 na SKMEL-28 naive pode ser observada nas bandas do gel (FIGURA 35-C), fica evidente que a diminuição de MMP-9 é consequência principalmente da forma ativa.

4.9.4. Metaloproteinase de matriz associada à membrana – 14 (MMP-14/ MT MMP-1)

A metaloproteinase 14 é responsável pela degradação de componentes da matriz e pela ativação da metaloproteinase -2. A fim de avaliar se o DM-1 pode modular esta enzima, as células foram analisadas por PCR em tempo real (FIGURA 36).

FIGURA 36: As linhagens SKMEL-19 naïve e resistente ao vemurafenibe e SKMEL-28 naïve e resistente ao vemurafenibe (identificadas na imagem como 19 N, 19 R, 28 N E 28 R respectivamente) foram tratadas com 5 μM e 8 μM de DM-1 e analisadas. (A) Expressão do mRNA de MMP-14. Os dados de mRNA foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por two way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O tratamento com DM-1 modulou positiva e negativamente a expressão de mRNA de MMP-14 para as linhagens SKMEL-19 e SKMEL-28 naive respectivamente

(FIGURA 36-A). A redução na expressão proteica foi observada para as três linhagens estudadas, entretanto outros ensaios são necessários para verificar se este perfil se repete nas outras linhagens (FIGURA 36-B).

4.9.5. Inibidor tecidual 2 de MMP (TIMP-2)

A TIMP-2 é um inibidor de metaloproteinase e o seu equilíbrio com a MMP-14 é um dos principais mecanismos de ativação da MMP-2.

FIGURA 37: As linhagens SKMEL-19 naïve e resistente ao vemurafenibe e SKMEL-28 naïve e resistente ao vemurafenibe (identificadas na imagem como 19 N, 19 R, 28 N e 28 R respectivamente) foram tratadas com 5 μM e 8 μM de DM-1 e analisadas. (A) Expressão do mRNA de TIMP-2, (B) Expressão proteica de TIMP-2, realizado em duplicata e (C) Expressão de TIMP-2 nos dois tipos celulares, a vinculina foi utilizada como controle endógeno. Os dados de mRNA foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por two way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A expressão de mRNA do inibidor TIMP-2 foi regulada positivamente e negativamente para as linhagens SKMEL-19 e -28 naive respectivamente (FIGURA 37). Para a expressão protéica não foi observada variação significativa na linhagem analisada, SKMEL-19 resistente ao vemurafenibe (FIGURA 37-B e -C).

Os perfis de expressão de mRNA para TIMP-2 analisados junto aos resultados de mRNA de MMP-14 (FIGURA 36) e atividade de MMP-2 (FIGURA 33-B) e MMP-14 (FIGURA 35-B), sugerem que para a SKMEL-19 naive, o aumento na expressão do inibidor e da MMP-14 levaram ao aumento na atividade de MMP-2 (FIGURA 33-B), já que o complexo TIMP-2/MMP-14 representam o principal mecanismo de ativação desta metaloproteinase (MORLEY et al., 2007), já a forma ativa de MMP-9 foi reduzida (FIGURA 35-B) pois outros mecanismos como o complexo ativador de plasminogênio do tipo uroquinase também representa uma importante forma de ativação desta endopeptidase.

Entretanto a SKMEL-28 naive teve redução dos níveis da forma ativa de MMP-2 (FIGURA 33-B) e MMP-9 (FIGURA 35-B), a qual foi acompanhada da diminuição de mRNA tanto de TIMP-2 (FIGURA 37-A) quanto de MMP-14 (FIGURA 36). A queda nos níveis dessas espécies sugerem perda de função do complexo TIMP-2/MMP-14 que refletem diretamente na redução da atividade de MMP-2 e, neste caso, também da MMP-9. Além disso a diminuição de TIMP-2 (FIGURA 37-A) após o tratamento foi de cerca de 25% enquanto a MMP-14 (FIGURA 36) cerca de 50%, indicando que além da perda de função do complexo, a inibição por TIMP-2 também pode ter sido responsável pela redução na atividade de MMP-2.

4.10. Ensaio de migração

A ação de metaloproteinases em conjunto com o processo migratório permite que movimentem pelos tecidos e, desta forma, auxiliem no processo de metástase (FRIEDL e WOLF, 2003). A fim de observar a ação do DM-1 com relação à migração de células de melanoma, realizamos o ensaio de ferida (*Wound healing assay*) e as fotos foram realizadas para acompanhar o comportamento dessas células e quantificação da migração (FIGURAS 38 e 39).

FIGURA 38: Ensaio de migração celular para células SKMEL 28 naive, após 24 horas a distância entre células no tratamento a 5 μ M foi quantificado pelo programa *Nis Elements*®. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por two way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

FIGURA 39: Ensaio de migração celular para células SKMEL-28 resistente ao vemurafenibe, após 30 horas a distância entre células no tratamento a 5 μ M foi quantificado pelo programa *Nis Elements*®. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por two way ANOVA seguida de análise de Bonferroni: ns (não significativo) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

As linhagens SK-MEL 28 parental e resistente ao vemurafenibe foram tratadas com doses subtóxicas de DM-1 pelo período necessário para fechar as feridas. Essas células apresentaram velocidades de migração diferentes, e foi necessário maior tempo de ensaio para que a SKMEL 28 resistente ao vemurafenibe fechasse a ferida. Após este período observamos que o DM-1 foi capaz de inibir a migração dessas células (FIGURAS 38 e 39).

A curcumina também reduziu a migração em células de câncer de mama, MDA-MB-231, e melanoma, A375, de maneira dose e tempo dependente (GUAN et al., 2016). O análogo FLLL 11 também inibiu a migração dessas mesmas células de câncer de mama. (LIN et al., 2009).

4.11. Ensaio de formação de tubos

A angiogênese no processo tumoral representa um processo importante na proliferação e metástase. A migração e a formação de tubos pelas células endoteliais representam um passo importante no processo metastático, este processo é induzido por diversos fatores com metaloproteinases (MMPs) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (NISHIDA et al, 2006). Com o propósito de avaliar a citotoxicidade do DM-1 em células endoteliais e na formação de tubos, tratamos essas células com concentrações crescentes de DM-1 (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M) e utilizamos as concentrações subtóxicas no ensaio de formação de tubos (FIGURA 40) Para ser capaz de realizar tais processos Células endoteliais foram expostas à, a fim de avaliar quais as concentrações subtóxicas para serem aplicadas no experimento (FIGURA 40).

FIGURA 39: (A) Gráfico de viabilidade das células endoteliais após tratamento com DM-1 (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M). (B) Imagens representativas de células endoteliais do controle (NT) que formaram tubos e, os tratamentos com 5 μ M e 10 μ M.

Primeiramente analisamos a citotoxicidade da curcumina em células endoteliais e observamos que a 10 μ M a viabilidade dessas células é reduzida pela metade, este resultado corrobora com a não seletividade do DM-1 que foi encontrada quando o expusemos a melanócitos e fibroblastos. Neste ensaio utilizamos 5 μ M e 10 μ M, porém para esta última concentração o número de células mortas é muito alto. O tratamento com a concentração mais baixa levou a desestruturação parcial dos tubos.

A viabilidade de células endoteliais (HUVECS) não é afetada significativamente até a concentração de 10 μ M de curcumina (SING et al, 1996), e quando aplicada a 10 μ M em HUVEC também é capaz de desestruturar parcialmente os tubos. Por outro lado os análogos da curcumina EF31 e UBS109 causaram total desestruturação a 250 nM e 750 nM respectivamente (NAGARAJU et al., 2014).

Estudos com curcumina mostraram que a inibição de angiogênese por esta molécula se deve a sua capacidade de inibição de VEGF que é um importante fator de sobrevivência para células endoteliais e induz a expressão de proteínas antiapoptóticas (KUNNUMAKKARA et al., 2007). Ela ainda suprime a proliferação de células endoteliais *in vivo* e *in vitro* e anula a resposta angiogênica (MOHAN et al., 2000).

Nossos resultados mostram que o DM-1 é citotóxico a células endoteliais e desestrutura parcialmente a formação desses tubos a concentrações maiores que outros análogos.

O inibidores de angiogênese podem interferir em muitos processos fisiológicos como cicatrização de feridas, pressão sanguínea, função renal, reprodução e ataque cardíaco. O tratamento realizado somente com inibidores não erradicam o tumor quando utilizados sozinhos e a combinação com outras drogas pode ser essencial para o tratamento dos pacientes (RAJABI e MOUSA, 2017).

5. CONCLUSÕES

O análogo da curcumina DM-1 possui atividade antitumoral em linhagens de melanoma naive e resistentes ao vemurafenibe, induzindo morte celular por apoptose, parada de ciclo em G1/G0 e diminuição do número de colônias. Entretanto este composto não é seletivo e com valores de IC₅₀ de 1,7 μ M, 14 μ M e 10 μ M para melanócitos, fibroblastos e células endoteliais respectivamente.

O tratamento de células de melanoma com DM-1 modulou negativamente algumas metaloproteinases, destacando-se as linhagens resistentes. A expressão de MMP-2 está relacionada com a resistência ao vemurafenibe e capacidade de invasão dessas células (SANDRI et al, 2016). Em nossos ensaios encontramos maiores concentrações de MMP-1 e -2 na linhagem SKMEL-28 resistente, e MMP-9 na SKMEL - 19 resistente e, após o tratamento as concentrações das endopeptidases caíram pelo menos 50% que correspondem a valores próximos aos obtidos para linhagens sensíveis ao vemurafenibe. Este composto modula diretamente a atividade das metaloproteinases, reduzindo os níveis dessas endopeptidase em diversos tipos celulares.

As modulações de mRNA de TIMP-2 e MMP-14 foram positivas para SKMEL-19 naive, associada ao aumento na atividade de MMP-2, e negativas para SKMEL-28 naive correlacionada com a diminuição na atividade de MMP-2 e -9. Este perfil demonstra uma ação interessante do DM-1 em metaloproteinases, que estão relacionadas diretamente com o processo invasivo.

O processo migratório foi inibido para duas linhagens celulares, SKMEL-28 naive e resistente, sendo que esta última está associada ao aumento da capacidade invasiva comparada a sua linhagem correspondente sensível à droga (SANDRI et al, 2016). Outro fenômeno essencial na metástase é a angiogênese e um teste a fim de avaliar de forma indireta este processo, pela formação de tubos por células endoteliais, mostrou que o DM-1 tem capacidade de desestruturar esses tubos à concentração de 5 μ M.

Esses resultados indicam que o DM-1 apresenta atividade em diversos alvos, como citotoxicidade, modulação de MMPs, parada de ciclo celular, migração de células de melanoma e formação de tubos por células endoteliais, além da regulação de TOP1

e ADK em células de melanoma naive e resistente conforme demonstrado em estudos prévios (OLIVEIRA et al, 2017). Entretanto alguns efeitos são tipo-celular dependentes, sendo que este perfil também é discutido e observado em outros trabalhos sobre os múltiplos alvos da curcumina.

A curcumina possui alta reatividade e baixa biodisponibilidade, caracterizando-a como PAINS (Pan-assay interference compounds). O elevado número de estudos pré-clínicos de curcuminóides e mais de 1000 análogos, 9000 publicações e 500 patentes registrados em um banco de dados sobre curcumina (CRDB- Curcumin Resource Database) demonstram que há um grande interesse científico e uma vasta quantidade de informação dormente que precisam ser analisados de forma mais global e interpretados sob o ponto de vista químico. Além disso a curcumina e seus análogos estruturalmente próximos não parecem ter propriedades que os caracterizam um bom candidato a ser tornar um fármaco (estabilidade química, alta solubilidade em água, atividade potente e seletiva, ampla distribuição nos tecidos, metabolismo estável e baixa toxicidade) (NELSON et al, 2017). Todas essas características nos mostram que, apesar dos resultados obtidos neste trabalho, outros experimentos e análises cuidadosos do DM-1 comparando-o tanto à curcumina quanto a outras moléculas semelhantes são primordiais, a fim de saber se o DM-1 possui vantagens sobre a curcumina, principalmente com relação às características que as classifica como PAINS.

6. Referências Bibliográficas

ADAMS, B.K.; CAI, J.; ARMSTRONG, J.; HEROLD, M.; LU, Y.J.; SUN, A.; SNYDER, J.P.; LIOTTA, D.C.; JONES, D.P.; SHOJI, M. EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox – dependent mechanism. **Anticancer Drugs**, v16 (3), 2005: 263-275.

ADAMS, B.K.; FERST, E.M.; DAVIS, M.C.; HEROLD, M.; KURTKAYA, S.; CAMALIER, R.F.; HOLLINGSHEAD, M.G.; KAUR, G.; SAUSVILLE, E.A.; RICKLES, F.R.; SNYDER, J.P.; LIOTTA, D.C.; SHOJI, M. Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v12 (14), 2004: 3871-3883.

AIROLA, K.; KARONEN, M.; VAALAMO, M.; LETHI, K.; LOHI, J.; KARINIEMI, A.L.; KESKI-OJA, J.; SAARIALHO-KERE, U.K. Expression of collagenase -1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. **Br Journal of Cancer**, v80, 1999:733-743.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A.B.; NEWMAN, R.A.; AGGARWAL, B.B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular. Pharmaceuticals**, v4 (6), 2007: 807-818.

ANAND, P.; THOMAS, S.G.; KUNNUMAKKARA, A.B. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, v76, 2008:1590-1611.

ANVISA. (<http://portal.anvisa.gov.br> – acessado em janeiro de 2017)

APALLA, Z.; NASHAN, D.; WELLER, R.; CASTELLSAGUÉ, X. Skin Cancer: Epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches. **Dermatology and Therapy**, v 7(Suppl. 1), 2017: 5-19.

APPLEBY, T.C.; GREESTIN, A.E.; HUNG, M.; LICLICAN, A.; VELASQUEZ, M.; VILLASENOR, A.G.; WANG, R.; WONG, M.H.; LIU, X.; PAPALIA, G.A.; SCHULTZ, B.E.; SAKOWICZ, R.; SMITH, V.; KWON, H.J. Biochemical characterization and structure determination of a potente, selective antibody inhibitor of human MMP-9. **The Journal of Biological Chemistry**, v292 (16), 2017> 6810-6820.

ATKINS, M.B.; LOTZE, M.T.; DUTCHER, J.P.; FISHER, R.I.; WEISS, G.; MARGOLIN, K.; ABRAMS, J.; SZNOL, M.; PARKINSON, D.; HAWKINS, M.; PARADISE, C.; KUNKEL, L.; ROSENBERG, S.A. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. **Journal of Clinical Oncology**, v17(7), 1999: 2105-2116.

BAELL, J.; WALTERS, M.A. Chemistry: Chemical com artists foil drug discovery. **Nature**, v513, 2014: 481-483.

BALBIN, M., FUEYO, A., TESTER, A.M., PENDAS, A.M., PITIOT, A.S., ASTUDILLO, A., OVERALL, C.M., SHAPIRO, S.D., LOPEZ-OTIN, C. Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. **Nature Genetics**, v 35, 2003: 252–257

BAO, B.; ALI, S.; BANERJEE, S.; WANG, Z.; LOGNA, F.; AZMI, A.S.; KONG, D.; AHMAD, A.; LI, Y.; PADHYE, S.; SARKAR, F. Curcumin analogue CDF inhibits pancreatic tumor growth by switching on suppressor microRNAs and attenuating EZH2 expression. **Cancer Research**, v72(1), 2012: 335-345.

BENBOW, U., SCHOENERMARK, M.P., MITCHELL, T.I., RUTTER, J.L., SHIMOKAWA, K., NAGASE, H., BRINCKERHOFF, C.E. A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type I collagen. **The Journal of Biological Chemistry**, v 274, 1992: 25371–25378.

BÉRUBÉ, M., DESCHAMBEAULT, A., BOUCHER, M., GERMAIN, L., PETITCLERC, L.; GUÉRIN, S.L. MMP-2 expression in uveal melanoma: differential activation status dictated by the cellular environment. **Molecular Vision**, v11, 2005: 1101-1111.

BEVONA, C.; GOGGINS, W.; QUINN, T.; FULLERTON, J.; TSAO, H. Cutaneous melanomas associated with nevi. **Archives of Dermatology**, v139, 2003:1620–1624.

BILL, M.A.; BAKAN, C.; BENSON JR, D.M.; FUCHS, J.; YOUNG, G.; LESINSKI, G.B. Curcumin induces pro-apoptotic effects against human melanoma cells and modulates the cellular response to immunotherapeutic cytokines. **Molecular Cancer Therapy**, v8 (9), 2009: 2726-2735.

BLACKBURN, J.S.; LIU, I.; COON, C.I.; BRINCKERHOFF, C.E.. A matrix metalloproteinase-1/protease activated receptor-1 signaling axis promotes melanoma invasion and metastasis. **Oncogene**, v28, 2009: 4237–4248

BOLLAG, G.; HIRTH, P.; TSAI, J.; ZHANG, J.; IBRAHIM, P.N.; CHO, H.; SPEVAK, W.; ZHANG, C.; ZHANG, Y.; HABETS, G.; BURTON, E.; WONG, B.; TSANG, G.; WEST, B.; POWELL, B.; SHELLOOE, R.; MARIMUTHU, A.; NGUYEN, H.; ZHANG, K.Y.J.; ARTIS, D.R.; SCHLESSINGER, J.; SU, F.; HIGGINS, B.; IYER, R.; D'ANDREA, K.; KOEHLER, A.; STUMM, M.; LIN, P.S.; LEE, R.J.; GRIPPO, J.; PUZANOV, I.; KIM, K.B.; RIBAS, A.; MCARTHUR, G.A.; SOSMAN, J.A.; CHAPMAN, P.B.; FLAHERTY, K.T.; XU, X.; NATHANSON, K.L.; NOLOP, K. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. **Nature**, v467 (7315), 2010:596-599.

BONIOL, M.; AUTIER, P.; BOYLE, P.; GANDINI, S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta analysis. **British Medical Journal**, v345, 2012: 4757-4770.

LAORDEN-SANCHEZ, B.; VIROS, A.; GIROTTI, M.R.; PEDERSEN, M.; SATURNO, G.; ZAMBON, A.; NICULESCU-DUVAZ, D.; TURAJJIC, S.; HAYES, A.; GORE, M.; LARKIN, J.; LORIGAN, P.; COOK, M.; SPRINGER, C.; MARAIS, R. BRAF Inhibitors Induce

Metastasis in RAS Mutant or Inhibitor-Resistant Melanoma Cells by Reactivating MEK and ERK. **Science Signaling**, v7(318), 2014: 30-48.

BRASIL. Secretaria de atenção à saúde. Aprova diretrizes diagnósticas e terapêuticas do melanoma maligno cutâneo. Portaria N 357, de 8 de abril de 2013.

BRUGGISSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta medica**, v68 (5), 2002: 445-448.

CACHIA, A.R.; INDSTO, J.O.; MCLAREN, K.M.; MANN, G.J.; ARENDS, M.J. *CDKN2A* mutation and deletion status in thin and thick primary melanoma. **Clinical Cancer Research** , v6, 2000: 3511–3515.

CAINI, S.; CATTARUZZA, S.; BENDINELLI, B.; TOSTI, G.; MASALA, G.; GNAGNARELLA, P.; ASSEDI, M.; STANGANELLI, I.; PALLI, D.; GANDINI, S. Coffe, tea and caffeine intake and the risk of non-melanoma câncer: a review of the literature and meta-analyses. **European Journal of Nutrition**, 56 (1), 2017: 1-12.

CHAN, V.T.; ZHANG, D.N.; NAGARAVAPU, U.; HULTQUIST, K.; ROMERO, L.I.; HERRON, G.S. Membrane-type matrix metalloproteinases in human dermal microvascular endothelial cells: expression and morphogenetic correlation. **Journal of Investigative Dermatology**., v111(6), 1998: 1153-1159.

CHAPMAN, P.B.; EINHORN, L.H.; MEYERS, M.L.; SAXMAN, S.; DESTRO A.N.; PANAGEAS, K.S.; BEGG, C.N.; AGARWALA, S.S.; SCHUCHTER, L.M.; ERNSTOFF, M.S.; HOUGHTON, A.N.; KIRKWOOD, J.M. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, v 17(9), 1999: 2745-2751

CHAPMAN, P.B.; HAUSCHILD, A.; ROBERT, C.; HAANEN, J.B.; ASCIERTO, P.; LARKIN, J.; DUMMER, R.; GARBE, C.; TESTORI, A.; MAIO, M.; HOGG, D.; LORIGAN, P.; LEBBE, C.; JOUARY, T.; SCHADENDORF, D.; RIBAS, A.; O'DAY, S.J.; SOSMAN, J.A.; KIRKWOOD, J.M.; EGGERMONT, A.M.; DRENO, B.; NOLOP, K.; LI, J.; NELSON, B.; HOU, J.; LEE, R.J.; FLAHERTY, K.T.; MCARTHUR, G.A. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **The New England Journal of Medicine**, v364 (26), 2011: 2507-2516.

CHEN, H.; YU, S.; CHEN, J.J.W.; LI, H.; LIN, Y.; YAO, P.; CHOU, H.; CHIEN, C.; CHEN, W.; LEE, Y.; YANG, P. Anti-invasive gene expression profile of curcumin in lung adenocarcinoma based on a high throughput microarray analysis. **Molecular Pharmacology**, v65(1), 2004:99-110.

CHENDIL, D.; RANGA, R.S.; MEIGOONI, D.; SATHISHKUMAR, S.; AHMED, M.M. Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. **Oncogene**, v23, 2004: 1599-1607.

CHOW, S.C.; CHIU, S.T. A note on design and analysis of clinical trials. **Drug Design.:Open Access**, v2, 2013:1-6.

CLARK, W.H. Jr; GUERRY, E.D. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **Journal of the National Cancer Institute.**, v81, 1989:1893-1904.

CLARK, W.H., JR.; ELDER, D.E.; GUERRY, D.T.; EPSTEIN, M.N.; GREENE, M.H.; VAN HORN, M. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology.**, v15, 1984: 1147–1165.

CORREA, T.C.S.; BROHEM, C.A.; WINNISCHOFER, S.M.B.; CARDEAL, L.B.S.; SASAHARA, R.M.; TABOGA, S.R.; SOGAYAR, M.C.; MARIA-ENGLER, S.M. Downregulation of the RECK-Tumor and Metastasis supressor gene in glioma invasiveness. **Journal of Cellular Biochemistry**, v99, 2006: 156-167.

CUI, J. & J.C. BYSTRYN. Melanoma and vitiligo are associated with antibody responses to similar antigens on pigment cells. **Archives of Dermatology**, v 131, 1995: 314– 318.

DANEN, E.H.; DE VRIES, T.J.; MORANDINI, R.; GHANEM, G.G.; RUITER, D.J.; VAN MUIJEN, G.N. E-cadherin expression in human melanoma. **Melanoma Research.**, v6, 1996: 127–131

DAUD, A.; WEBER, J.; SOSMAN, J.; KIM, K.; GONZALEZ, R.; HAMID, O. Updated overall survival (OS) results for BRF 113220, a phase I-II study of dabrafenib alone *versus* combined dabrafenib and trametinib in patients with BRAF V600 metastatic melanoma (MM). **Journal of Clinical Oncology**, v33, 2015: 9036.

DAVIES, H., BIGNELL, G.R., COX, C.; STEPHENS, P.; EDKINS, S.; CLEGG, S.; TEAGUE, J.; WOFFENDIN, H.; GARNETT, M.J.; BOTTOMLEY, W.; DAVIS, N.; DICKS, E.; EWING, R.; FLOYD, Y.; GRAY, K.; HALL, S.; HAWES, R.; HUGHES, J.; KOSMIDOU, V.; MENZIES, A.; MOULD, C.; PARKER, A.; STEVENS, C.; WATT, S.; HOOPER, S.; WILSON, R.; JAYATILAKE, H.; GUSTERSON, B.A.; COOPER, C.; SHIPLEY, J.; HARGRAVE, D.; PRITCHARD-JONES, K.; MAITLAND, N.; CHENEVIX-TRENCH, G.; RIGGINGS, G.J.; BIGNER, D.D.; PALMIERI, G.; COSSU, A.; FLANAGAN, A.; NICHOLSON, A.; HO, J.W.; LEUNG, S.Y.; YUEN, S.T.; WEBER, B.L.; SEIGLER, H.F.; DARROW, T.L.; PATERSON, H.; MARAIS, R.; MARSHAL, C.J.; WOOSTER, R.; STRATTON, M.R.; FUTREAL, P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v410 (6892), 2002: 949–54.

DAVIES, M.A., The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. **The Cancer Journal**, v8 (2), 2012: 142-147.

DEBNIK, T.; JAKUBOWSKA, A.; SERRANO-FERNANDEZ, P.; KURZAWSKI, G.; CYBULSKI, C.; CHAUHAN, S.R.; LAXTON, R.C.; MALESZKA, R.; LUBINSKI, J.; YE, S. Association of MMP8 gene variation with an increased risk of malignant melanoma. **Melanoma Research**. 21, 2011: 464–468.

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

DEVY, L., HUANG, L., NAA, L., YANAMANDRA, N., PIETERS, H., FRANS, N., CHANG, E., TAO, Q., VANHOVE, M., LEJEUNE, A., VAN GOOL, R., SEXTON, D.J., KUANG, G., RANK, D., HOGAN, S., PAZMANY, C., MA, Y.L., SCHOONBROODT, S., NIXON, A.E., LADNER, R.C., HOET, R., HENDERIKX, P., TENHOOR, C., RABBANI, S.A., VALENTINO, M.L., WOOD, C.R., DRANSFIELD, D.T. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. **Cancer Research**, v69, 2009: 1517–1526.

DHILLON, N.; AGGARWAL, B. B.; NEWMAN, R. A.; WOLFF, R. A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; ABBRUZZESE, J. L.; NG, C. S.; BADMAEV, V.; KURZROCK, R. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, v14, 2008: 4491–4499.

EGEBLAD M, WERB Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews Cancer**, v2, 2002:161–174.

EIDE, M.J.; KRAJENTA, R.; JOHNSON, D.; LONG, J.J.; JACOBSEN, G.; ASGARI, M.M.; LIM, H.W.; JOHNSON, C.C. Identification of patients with nonmelanoma skin cancer using health maintenance organization claims data. **American Journal of Epidemiology**, v171 (1), 2010: 123-128.

EROGLU, Z.; RIBAS, A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v8(1), 2016: 48-56.

FAIÃO-FLORES F., SUAREZ J.A., PARDI, P. C., MARIA, D.A. DM-1, sodium 4- [5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxo-penta-1,4-dienyl]-2- methoxy-phenolate: a curcumin analog with a synergic effect in combination with paclitaxel in breast cancer treatment. **Tumour Biology**, v33, 2012:775–785.

FAIÃO-FLORES F., SUAREZ J.A., SOTO-CERRATO, V., ESPONA-FIEDLER, M., PÉREZ-TOMÁS, R., MARIA, D.A.. Bcl-2 family proteins and cytoskeleton changes involved in DM-1 cytotoxic effect on melanoma cells. **Tumor Biology**, v34(2), 2013: 1235-1243.

FALCHOOK, G.S.; LONG, G.V.; KURZROCK, R.; KIM, K.B.; ARKENAU, T.H.; BROWN, M.P.; HAMID, O.; INFANTE, J.R.; MILLWARD, M.; PAVLICK, A.C.; O'DAY, S.J.; BLACKMAN, S.C.; CURTIS, C.M.; LEBOWITZ, P.; MA, B.; OUELLET, D.; KEFFORD, R.F. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. **The Lancet**, v379 (9829), 2012:1893-1901.

FERNANDES, T.; ANGELO-ANDRADE, L.A.; MORAIS, S.S.; PINTO, G.A.; CHAGAS,C.A.; MARIA-ENGLER, S.S.; ZEFERINO, L.C. Stromal cells play a role in

cervical câncer progression mediated by MMP-2 protein. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v29(4), 2008: 341-344.

FINI, M.E.; COOK, J.R.; MOHAN, R.; BRINCKERHOFF, C.E. Regulation of MMP gene expression, in Parks WC, Mecham RP. Matrix Metalloproteinases. **San Diego, CA, Academic Press**, 1998: 299-356

FLAHERTY, K.T.; PUZANOV, I.; KIM, K.B.; RIBAS, A.; MCARTHUR, G.A.; SOSMAN, J.A.; O'DWYER, P.J.; LEE, R.J.; GRIPPO, J.F.; NOLOP, K.; CHAPMAN, P.B. Inhibition of mutated activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med.*, v363 (9), 2010: 809-819.

FRANKEN, N.A.; RODERMOND, H.M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; vanBREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v1(5), 2006: 2315-2319.

FRIEDMAN, L.; LIN, L.; BALL, S.; BEKAIL-SAAB, T.; FUCHS, J.; LI, P.; LI, C.; LIN, J. Curcumin analogues exhibit enhanced growth suppressive activity in human pancreatic câncer cells. **Anticancer Drugs**, v20(6), 2009:444-449.

GALVEZ, B.G.; MATÍAS-ROMÁN, S.; ALBAR, J.P.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; ARROYO, A.G. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. **The Journal of Biological Chemistry**, v276(40), 2001:37491-500.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A.D.; KARAMANOS, N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **The FEBS Journal**, v278(1), 2011: 16-27.

GLASER, J.; HOLZGRABE, U. Focus on PAINS: False friends in the quest for selective anti-protozoal lead structures from nature? **MedChemComm**, v7, 2016: 214-223.

GRIGNON, D. J., SAKR, W.; TOTH, M.; RAVERY, V.; ANGULO, J.; SHAMSA, F.; PONTES, J.E.; CRISSMAN, J.C.; FRIDMAN, R. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) expression are associated with poor outcome in invasive bladder cancer. **Cancer Research.**, v56, 1996: 1654–1659.

GROSS, J., LAPIERE, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v48, 1962:1014–1022.

GUAN, F.; DING, Y.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; MINGXIN, L.; WANG, C. Curcumin suppresses proliferation and migration of MDA-MB-231 breast câncer cells through autophagy-dependent AKT degradation. **PLoS One**, v11 (1), 2016: 1-18.

HAHM, E.R.; GHO, Y.S.; PARK, S.; PARK, C.; KIM, K.W.; YANG, C.H. Synthetic curcumin analogs inhibit activator protein-1 transcription and tumor –induced angiogenesis. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v321 (2), 2004: 337-344.

HALUSKA, F.G.; TSAO, H.; WU, H.; HALUSKA, F.S.; LAZAR, A.; GOEL, V. Genetic alterations in signalling pathways in melanoma. **Clinical Cancer Research**, v2 (7 pt 2), 2006: 2301s-2307s.

HAMANO, Y.; KALLURI, R. Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v333, 2005: 292–298.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v144 (5), 2011: 646-674

HASSAN, Z.K.; DAGHESTANI, M. H. Curcumin effect on MMPs and TIMPs Genes in a breast cancer cell line. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v13, 2012:3259-3264.

HE, G.; FENG, C.; VINOTHKUMAR, R.; CHEN, W.; DAI, X.; CHEN, X.; YE, Q.; CHENYU, Q.; ZHOU, H.; WANG, Y.; LIANG, G.; XIE, Y.; WU, W. Curcumin analog EF24 induces apoptosis via ROS-dependent mitochondrial dysfunction in human colorectal cancer cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v78(6), 2016:1151-1161.

HODI, F.S.; O'DAY, S.J.; MCDERMOTT, D.F.; WEBER, R.W.; SOSMAN, J.A.; HAANEN, J.B.; GONZALEZ, R.; ROBERT, C.; SCHADENDORF, D.; HASSEL, J.C.; AKERLEY, W.; VAN DEN EERTWEGH, A.J.; LUTZKY, J.; LORIGAN, P.; VAUBEL, J.M.; LINETTE, G.P.; HOGG, D.; OTTENSMEIER, C.H.; LEBBÉ, C.; PESCHEL, C.; QUIRT, I.; CLARK, J.I.; WOLCHOK, J.D.; WEBER, J.S.; TIAN, J.; YELLIN, M.J.; NICHOL, G.M.; HOOS, A.; URBA, W.J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v 363 (8), 2010: 711-723.

HOFMANN, U.B.; EGGERT, A.A.O.; BLASS, K.; BROCKER, E.B.; BECKER, J.C. Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. **Cancer Research**, v63 (23), 2003: 8221–8225.

HOFMANN, U.B.; WESTPHAL, J.R.; VAN MUIJEN, G.N.P.; RUITER, D.J. Matrix metalloproteinase in human melanoma. **J Invest Dermatol.**, v115(3), 2000:337-344.

HSU, M.Y.; WHEELLOCK, M.J.; JOHNSON, K.R.; HERLYN, M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. **Journal of Investigative Dermatology**, v1, 1996: 188–194.

HU, A.; HUANG, J.; LI, R.; LU, Z.; DUAN, J.; XU, W.; CHEN, X.; FAN, J. Curcumin as therapeutics for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma by activating SIRT1. **Scientific Reports**, v5, 2015: 1-14.

HUNCHAREK, M.; CAUBET, J.F.; MCGARRY, R. Single – agente DTIC versus combination chemotherapy with or without immunotherapy in metastatic melanoma: a meta – analysis of 3273 patients from 20 randomized trials. **Melanoma Research**, v11, 2001: 75-81.

HURLSTONE, D.P.; KARAJEH, M.; SANDERS, D.S.; DREW, S.K.; CROSS, S.S. Rectal aberrant crypt foci indentified using high magnification chromoscopic colonoscopy: biomarkers for flat and depressed neoplasia. **The American Journal of Gastroenterology**, v100(6), 2005: 1283-1289.

HUTZEN, B.; FRIEDMAN, L.; SOBO, M.; LIN, L.; CEN, L.; ANGELIS, S.; YAMAKOSHI, H.; SHIBATA, H.; IWABUCHI, Y.; LIN, J. Curcumin analogue GO-Y030 inhibits STAT3 activity and cell growth in breast and pancreatic carcinomas. **International journal of oncology**, v35, 2009: 867-872.

IIDA, J.; WILHELMSON, K.L.; PRICE, M.A.; WILSON, C.M.; PEI, D.; FURCHT, L.T.; MCCARTHY, J.B. Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth. **Journal of Investigative Dermatology**, v122, 2004: 167–176.

BARAN, J. L.; DUNCAN, L.M. Combined melanocytic nevi: Histologic variants and melanoma mimics. **The American Journal of Surgical Pathology**, v35(10), 2011: 1540-1549.

CRAWFORD, A.B.; NESSIM, C.; WEAVER, J.; WALRAVEN, C.V. Wait times for melanoma surgery: Is there na association with overall survival? **Annals of surgical oncology**, 2017: 1-6.

DAMSKY, W.E.; BOSENBERG, M. Melanocytic nevi and melanoma:Unraveling a complex relationship. **Oncogene**, 2017: 1-22.

DAMSKY, W.E.; BOSENBERG, M. Melanocytic nevi and melanoma:Unraveling a complex relationship. **Oncogene**, v36(42), 2017: 1-22.

DAMSKY, W.E; THEODOSAKIS, N.; BOSENBERG. M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. **Oncogene**,;v 33, 2014: 2413–2422.

DURKOA, M.; NAVABA, R.; SHIBATAAB, R.H.; BRODTAB,P. Suppression of basement membrane type IV collagen degradation and **cell invasion in human melanoma cells expressin an antisense RNA for MMP-1**. **Biochimica er Biophysica Acta (BBA)-Molecular cell research**, v1356 (3), 1997: 271-280.

DURKOA, M.; NAVABA, R.; SHIBATAAB, R.H.; BRODTAB,P. Suppression of basement membrane type IV collagen degradation and cell invasion in human melanoma cells expressin an antisense RNA for MMP-1. **Biochimica er Biophysica Acta (BBA)-Molecular cell research**, v1356 (3), 1997: 271-280.

FAIÃO-FLORES, F.; SUAREZ, A.Q.S.; PARDI, P.C., MARIA, D.A. DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxopenta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate: a curcumin analog with a synergic effect in combination with paclitaxel in breast cancer treatment. **Tumor Biology**, 2012, v33:775-785.

FAIÃO-FLORES, F.; SUAREZ, A.Q.S.; PARDI, P.C., MARIA, D.A. DM-1, sodium 4-[5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxopenta-1,4-dienyl]-2-methoxy-phenolate: a curcumin analog with a synergic effect in combination with paclitaxel in breast cancer treatment. **Tumor Biology**, v33, 2012:775-785.

FAIÃO-FLORES, F.; SUAREZ, J.A.Q.; SOTO-CERRATO, V.; ESPONA-FIEDLER, M.; PEREZ-TOMÁS, R.; MARIA, D.A. Bcl-2 family proteins and cytoskeleton changes involved in DM-1 cytotoxic effect on melanoma cells, **Tumor Biology**, 2013b, v34: 1235-1243.

FAIÃO-FLORES, F.; SUAREZ, J.A.Q.; SOTO-CERRATO, V.; ESPONA-FIEDLER, M.; PEREZ-TOMÁS, R.; MARIA, D.A. Bcl-2 family proteins and cytoskeleton changes involved in DM-1 cytotoxic effect on melanoma cells. **Tumor Biology**, v34, 2013b: 1235-1243.

FAIÃO-FLORES, F.; SUAREZ, J.Q.; MARIA-ENGLER, S.S.; SOTO-CERRATO, V.; PÉREZ-TOMÁS, R.; MARIA, D.A. The curcumin analog induces apoptotic cell death in melanoma. **Tumor biology**, v34, 2013a,:1119,1129.

FAIÃO-FLORES, F.; SUAREZ, J.Q.; MARIA-ENGLER, S.S.; SOTO-CERRATO, V.; PÉREZ-TOMÁS, R.; MARIA, D.A. The curcumin analog induces apoptotic cell death in melanoma. **Tumor biology**, v34, 2013a:1119,1129.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature**, v3 (5), 2003.362-374.

GERSHENWALD, J.E.; SCOLYER, R.A.; HESS, K.R.; SONDAK, V.K.; LONG G.V; ROSS, M.I.; LAZAR, A.J.; FARIES, M.B.; KIRKWOOD, J.M.; MCARTHUR, G.A.; HAYDU, L.E.; EGGERMONT, A.M.M.; FLAHERTY, K.T.; BALCH, C.M.; THOMPSON, J.F. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: Cancer Journal for Clinicians** , v67(6), 2017: 472-492.

GIROUARD, S.D.; MURPHY, G. Melanoma stem cells: not rare, but well done. **Laboratory Investigation**, v91, 2011: 647-664.

GRYMKIEWICZ, G.; SLIFIRSKI, P. Curcumin and curcuminóides in quest for medical status. **ActaABO biochimica polonica**, v59(2), 2012: 201-212.

GRYMKIEWICZ, G.; SLIFIRSKI, P. Curcumin and curcuminóides in quest for medical status. **ActaABO biochimica polonica**, v59(2), 2012: 201-212.

INFANTE JR, FECHER LA, NALLAPAREDDY S, GORDON MS, BECERRA C, DEMARINI DJ, COX DS, XU Y, MORRIS SR, PEDDAREDDIGARI VG, LE NT, HART L, BENDELL JC, ECKHARDT G, KURZROCK R, FLAHERTY K. Safety and efficacy results from the first-in-human study of the oral MEK 1/2 inhibitor GSK1120212. IN: **ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY**, June 4–8 2010.

ITOH, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. **Matrix Biology**, v44-46, 2015, 207-223.

JÁ, L.; FISHER, D.E. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. **Science**, v346 (6212), 2014: 945-949.

JABLONSKA-TRYPUC, A.; MATEJCZYK, M.; ROSOCHACKI, S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v 31 (1), 2016: 177-183.

JACKSON, H.W.; DEFAMIE, V.; WATERHOUSE, P.; KHOKHA, R. TIMPs: versatile extracellular regulator in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v17(1), 2017: 38-53.

JIANG, A.; JIANG, G.; LI, L.; ZHENG, J. Curcumin induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human melanoma cells. **Molecular Biology Reports**, v42, 2015: 267-275.

JIAO, Y.; FENG, X.; ZHAN, Y.; WANG, R.; ZHENG, S.; LIU, W.; ZENG, X. Matrix metalloproteinase-2 promotes α v β 3 integrin-mediated adhesion and migration of human melanoma cells by cleaving fibronectin. **PLoS ONE**, v7, 2012: e41591

JIMENO, A.; HIDALGO, M. Multitargeted therapy: can promiscuity be praised in an era of polyclonal correctness? **Critical Reviews in Oncology/ Hematology**, v59, 2006:150-158.

JOHANSSON, N.; AIROLA, K.; GRENMAN, R.; KARINIEMI, A.L.; SAARIALHO-KERE, U.; KAHARI, V.M. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck **The American Journal of Pathology**, v151, 1997: 499-508.

KALLURI R, WEINBERG RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v119 2009:1420- 1428.

KAMB, A.; SHATTUCK-EIDENS, D.; EELES, R.; LIU, Q.; GRUIS, N.A.; DING, W.; HUSSEY, C.; TRAN, T.; MIKI, Y.; WEAVER-FELDHAUS, J.; MCCLURE, M.; AITKEN, J.F.; ANDERSON, D.E.; BERGMAN, W.; FRANTS, R.; GOLDDAR, D.E.; GREEN, A.; MACLENNAN, R.; MARTIN, N.G.; YOUL, P.; ZONE, J.J.; SKOLNICK, M.H.; ALBRIGHT-CANNON, L.A. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. **Nature Genetics**, v8, 1994: 23-26

KAPOOR, C.; VAIDYA, S.; WADHWAN, V.; HITESH, KAUR, G.; PATHAK, A. Seesaw of matrix metalloproteinase (MMPs). **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v12 (1), 2016:28-35.

KESSENBRICK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**, v141 (1), 2010: 52-67

KIM KB, LEWIS K, PAVLICK A, INFANTE JR, RIBAS A, SOSMAN JA, FECHER LA, MILLWARD M, MCARTHUR GA, HWU P, GONZALEZ R, OTT PA, LONG GV, GARDNER OS, OUELLET D, XU Y, DEMARINI DJ, LE NT, PATEL K, LEWIS KD. . A Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor GSK1120212 in metastatic BRAF-V600E or K mutant cutaneous melanoma patients previously treated with or without a BRAF inhibitor. **Pigment Cell Melanoma Research**, v24, 2011:102-102

KIM, G.; MCKEE, A.E.; NING, Y.; HAZARIKA, M.; THEORET, M.; JOHNSON, J.R.; XU, Q.C.; TANG, S.; SRIDHARA, R.; JIANG, X.; HE, K.; ROSCOE, D.; MCGUINN, W.D.; HELMS, W.S.; RUSSEL, A.M.; MIKSINSKI, S.P.; ZIRKELBACH, J.F.; EARP, J.; LIU, Q.; IBRAHIM, A.; JUSTICE, R.; PAZDUR, R.FDA approval summary: vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAF V600E mutation.Clin Cancer Res; 20(19);2014: 4994–5000.

KINOH, H.; SATO, H.; TSUNEZUKA, Y.; TAKINO, T.; KAWASHIMA, A.; OKADA, Y.; SEIKI, M. MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. **Journal of Cell Science**, v109 (pt5), 1996: 953-959.

KNÄUPER V, MURPHY G: Membrane-type matrix metalloproteinases and cell surface-associated activation cascades for matrix metalloproteinases, in Parks WC, Mecham RP (eds): Matrix Metalloproteinases. San Diego, CA, Academic Press, 1998:199-218.

KOMENAKA, I.; HOERIG, H.; KAUFMAN, H.L. Immunotherapy for melanoma. **Clinical Dermatology**, v22(3), 2004: 251-265.

KOO, H.J, SHIN, S., CHOI, J.Y., LEE, K.H, KIM, B.T, CHOE, Y.S. Introduction of Methyl Groups at C2 and C6 Positions Enhances the Antiangiogenesis Activity of Curcumin. **Scientific Reports**, v5, 2015: 1205-1225

KUMAR, D.; KUMAR, M.; SARAVANAN, C.; SINGH, S.K. Curcumin: a potential candidate for matrix metalloproteinase inhibitors. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v16(10), 2012:959-972

KUNNUMAKKARA, A.B; ANAND, P.; AGGARWAL, B.Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of diferente cancers through interaction with multiple cell signalling proteins.**Cancer Letter**, v269, 2008: 199-225.

KUNNUMAKKARA, A.B.; GUHA, S.; KRISHNAN, S.; DIAGARADJANE, P.; GELOVANI, J.; AGGARWAL, B.B. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor- κ B-regulated gene products. **Cancer Research**, v 67 (8),2007: 3853–3861.

KURCHAT, P.; WICKENHAUSER, C.; GROTH, W.; KRIEG, T.; MAUCH, C. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic

enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. **The Journal of Pathology**. 197, 2002: 179–187.

KUTTAN, R.; BHANUMATHY, P.; NIRMALA, K.; GEORGE, M.C. Potential anticancer activity of tumeric (*Curcuma longa*). **Cancer Letter.**, v29, 1985:197-202.

LAFLEUR, M.A.; HANDSLEY, M.M.; EDWARD, D.R. Structure-dependent subgrouping of the matrix metalloproteinases (MMPs). **Molecular Medicine**, v5, 2003: 22-32.

LAN, Y.; ZHANG, C.; XIAO, J.; ZHUO, Y.; GUO, H.; PENG, W.; GE, J. Suppression of $\text{I}\kappa\beta\alpha$ increases the expression of matrix metalloproteinase-2 in human ciliary muscle cells. **Molecular Vision**, v15, 2009: 1977-1987.

LEE, N.; BARTHEL, S.; SCHATTON, T. Melanoma stem cells and Metastasis: mimicking hematopoietic cell trafficking? **Laboratory Investigation**, v94 (1), 2013: 13-30.

LEINONEN, T.; PIRINEN, R.; BÖHM, J.; JOHANSSON, R.; KOSMA, V.M. Increased expression. Of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer. **Histology and Histopathology**, v23 (6), 2008: 693-700.

LEONARDO, G.P. Validação de método bioanalítico, farmacocinética e biodistribuição do DM-1 em camundongos. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Farmácia na Área de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – **Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo**, 2002.

LEUNG, M.H.M., KEE, T.W. Effective stabilization of curcumin by association to plasma protein: human serum albumin and fibrinogen. **Langmuir**, v25, 2009: 5773-5777.

LI, Y.; ZHANG, J.; MA, D.; ZHANG, L.; MENG, S.; YIN, H.; LI, J. Curcumin inhibits proliferation and invasion of osteosarcoma cells through inactivation of Notch-1 signaling. **The FEBS Journal**, v279 (12), 2012: 2247-2259.

LIN, L.; HUTZEN, B.; BALL, S.; FOUST, E.; SOBO, M.; DEANGELIS, S.; PANDIT, B.; FRIEDMAN, L.; LI, C.; LI, P.; FUCHS, J.; LIN, J. New curcumin analogues exhibit enhanced growth-suppressive activity and inhibit AKT and signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation in breast and prostate cancer cells. **Cancer Science**, v100 (8), 2009: 1719-1727.

LIN, L.; HUTZEN, B.; BALL, S.; FOUST, E.; SOBO, M.; DEANGELS, S.; PANDIT, B.; FRIEDMAN, L.; LI, C.; LI, P.; FUCHTS, J.; LIN, J. New curcumin analogues exhibit enhanced growth – suppressive activity and inhibit AKT and signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation in breast and prostate cancer cells. **Cancer Science**, v100 (9), 2009: 1719-1727.

LIU, H.; KATO, Y.; ERZINGER, S.A.; KIRIAKOVA, G.M.; QIAN, Y.; PALMIERI, D.; STEEG, P.S.; PRICE, J.E. The role of MMP-1 in breast cancer growth and metastasis to the brain in a xenograft model. **BMC Cancer**, v12, 2012:583-594.

LIU, T.; TAN, Z.; JIANG, L.; GU, J.; WU, X.; CAO, Y.; LI, M.; WU, K.; LIU, Y. Curcumin induces apoptosis in gallbladder carcinoma cell line GBC-SD cells. **Cancer Cell International**, v 13 (1), 2013:13- 64

LOPEZ-OTIN, C.; PALAVALLI, L.H.; SAMUELS, Y. Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. **Cell Cycle**, v8, 2009: 3657–3662.

LU, K.V.; JONG, K.A.; RAJASEKARAN, A.K.; CLOUGHESY, T.F.; MISCHER, P.S. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. **Laboratory Investigation**, v84, 2004: 8-20.

LUCE, J.K. Chemotherapy of malignant melanoma. **Cancer**, v30, 1972 :1604-1615.

MACDOUGALL, J.R.; BANI, M.R.; LIN, Y.; MUSCHEL, R.J.; KERBEL, R.S. Proteolytic switching: opposite patterns of regulation of gelatinase B and its inhibitor TIMP-1 during human melanoma progression and consequences of gelatinase B overexpression. **British Journal of Cancer**, v80, 1999: 504–512

MENZIES, A.M.; LONG, G.V.; MURALI, R. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. **Drug Design, Development and Therapy**, v6, 2012: 391-405.

MENZIES, A.M.; LONG, G.V.; MURALI, R. Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. **Drug Design, Development and Therapy**, v6 2012:391-405.

MICHALUK, P.; KACZMAREK, L. Matrix metalloproteinase-9 in glutamate-dependent adult brain function and dysfunction. **Cell Death and Differentiation**, v14, 2007:1255-1258.

MILLER, A.J.; MIHM, M.C. JR. Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v355 (1), 2006:: 51–65

MOHAN, R.;SIVAK, J.;ASHTON, P.; RUSSO, L.A.; PHAM, B.Q.; KASAHARA, N.; RAIZMAN, M.B.; FINI, M.E.Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B. **The Journal of Biological Chemistry**, v 275 (14), 2000: 10405– 10412.

MONTGOMERY, A.M.P.; MUELLER, B. M.; REISFIELD, R.A.; TAYLOR, S.M.; DECLERCK, Y.A. Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. **Cancer Research**, v54(20), 1994:5467-5473.

MOON, H., DONAHUE, L.R., CHOI, E.; SCUMPIA, P.; LOWRY, W.E., GRENE, J.K., ZHU, J., WHITE, A.C. Melanocyte stem cell activation and translocation initiate cutaneous melanoma in response to UV exposure. **Cancer stem cell**, v21 (5),2017: 1-14.

MOON, H., DONAHUE, L.R., CHOI, E.; SCUMPIA, P.; LOWRY, W.E., GRENE, J.K., ZHU, J., WHITE, A.C. Melanocyte stem cell activation and translocation initiate cutaneous melanoma in response to UV exposure. **Cancer stem cell**, v21(5), 2017: 666-678.

MORENO-CÁCERES, J.; CAJA, L.; MAINEZ, J.; MAYORAL, R.; MARTÍN-SANZ, P.; MORENO-VICENTE, R.; DEL POZO, M.A.; DOOLEY, S.; EGEA, G.; FABREGAT, I. Caveolin-1 is required for TGF β -induced transactivation of the EGF receptor pathway in hepatocytes through the activation of the metalloprotease TACE/ADAM17. **Cell Death Discovery**, v5, 2014: e1326.

MORLEY, M.E.; RICHES, K.; PEERS, C.; PORTER, K.E. Hypoxic inhibition of human cardiac fibroblast invasion and MMP-2 activation may impair adaptive myocardial remodelling. **Biochemical Society Transactions**, v35 (5), 2007: 905-907.

NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: Role for cell migration. **Pathology International**, v52,2002:255-64.

NAGARAJU, G.P.; ZHU, S.; KO, J.E.; ASHRITHA, N.; KANDIMALLA, R.; SNYDER, J.P.; SHOJI, M.; EL-RAYES, B. Antiangiogenic effects of a novel synthetic curcumin analogue in pancreatic cancer. **Cancer Letters**, v357 (2), 2015: 557-565.

NCI - National cancer institute – FDA approval for trametinib (<https://www.cancer.gov> – acessado em janeiro de 2017)

NELSON, K.M.; DAHLIN, J.L.; BISSON, J.; GRAHAM, J.; PAULI, G.F.; WALTERS, M.A. The essential medicinal chemistry of curcumin. **Journal of medicinal chemistry**, v60(5), 2017: 1620-1637.

NELSON, K.M.; DAHLIN, J.L.; BISSON, J.; GRAHAM, J.; PAULI, G.F.; WALTERS, M.A. The essential medicinal chemistry of curcumin. **Journal of medicinal chemistry**, v60(5), 2017: 1620-1637.

NIKKOLA, J.; VIHINEN, P.; VUORISTO, M.S.; KELLOKUMPU-LEHTINEN, P.; KÄHÄRI, V.M.; PYRHÖNEN, S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. **Clinical Cancer Research**, v 11(14), 2005:5158-5166.

NIKKOLA, J.; , VIHINEN, P.; VUORISTO, M.S.; KELLOKUMPU-LEHTINEN, P.; KÄHÄRI, V.M.; PYRHÖNEN, S. **ClinicalCancer Research**, v11(14), 2005:5158-66.

NIKKOLA, J.; VIHINEN, P.; VLAYKOVA, T.; HAHKA-KEMPPINEN, M.; KAHARI, M.; PYRHONEN, S. High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. **International Journal of Cancer**, v97, 2002: 432–438.

NIKKOLA, J.; VIHINEN, P.; VLAYKOVA, T.; KEMPPINEN-HAHKA, M.; KÄHÄRI, V.M.; PYRHÖNEN; S. High expression. Levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate

with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. **International Journal of Cancer**, 97(4), 2002: 423-428.

NIKKOLA, J.; VIHINEN, P.; VLAYKOVA, T.; KEMPPINEN-HAHKA, M.; KÄHÄRI, V.M.; PYRHÖNEN, S. High expression. Levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. **International Journal of Cancer**, 97(4), 2002: 423-428.

NISHIDA, N.; YANO, H.; NISHIDA, T.; KAMURA, T.; KOJIRO, M. Angiogenesis in Cancer. **Vascular Health and Risk Management**, v2(3), 2006: 213-219.

ODOT, J.; ALBERT, P.; CARLIER, A.; TARPIN, M.; DEVY, J.; MADOULET, C. In vitro and in vivo anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells. **International Journal of Cancer**, v111, 2004: 381-387.

OETARI, S.; SUDIBYO, M.; COMMANDEUR, J.N.M.; SAMHOEDI, R.; VERMEULEN, N. P.E. Effects of curcumin on cytochrome P450 and glutathione S-Transferase activities in Rat Liver. **Biochemical Pharmacology**, v.51, 1996: 39-45.

OHON, H.; YAMAKOSHI, H.; TOMIZAWA, M.; SHIBUYA, M.; KAKUDO, Y.; TAKAHASHI, A.; TAKAHASHI, S.; KATO, S.; SUZUKI, T.; ISHIOKA, C.; IWABUCHI, Y.; SHIBATA, H. Synthesis and biological analysis of new curcumins analogues bearing na enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. **American Association for Cancer Research**, v5 (10), 2006: 2563-2571.

OHON, H.; YAMAKOSHI, H.; TOMIZAWA, M.; SHIBUYA, M.; KAKUDO, Y.; TAKAHASHI, A.; TAKAHASHI, S.; KATO, S.; SUZUKI, T.; ISHIOKA, C.; IWABUCHI, Y.; SHIBATA, H. Synthesis and biological analysis of new curcumins analogues bearing na enhanced potential for the medicinal treatment of cancer. **American Association for Cancer Research**, v5 (10), 2006: 2563-2571.

OHUCHI, E.; IMAI, K.; FUJI, Y.; SATO, H.; SEIKI, M.; OKADA, Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. **The Journal of Biological Chemistry**, v272(4), 1997: 2446-51.

OMHOLT, K.; PLATZ, A.; KANTER, L.; RINGBORG, U.; HANSSON, J. *NRAS* and *BRAF* mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. **Clinical Cancer Research**, v9, 2003: 6483-6488.

OVERALL, C. M. & KLEIFELD, O. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. **Nature.Reviews Cancer**, v6, 2006: 227-239.

OZLEM, E. Cancer stem cells in solid tumors. **Onkologie**, v32, 2009: 605-609.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v8, 2007:221-233.

PAN, M.H.; HUANG, T.M.; LIN, J.K. Biotransformation of cucumin through reduction and glucuronidation in mice. **Drug Metabolism & Disposition**, v27, 1999: 486-497.

PANDA, A.K.; CHAKRABORTY, D.; SARKAR, I.; KHAN, T. AS, G. New insights into therapeutic activity and anticâncer properties of curcumin. **Journal of experimental pharmacology**, v9, 2017:31-45.

PANDA, A.K.; CHAKRABORTY, D.; SARKAR, I.; KHAN, T.; AS, G. New insights into therapeutic activity and anticâncer properties of curcumin. **Journal of experimental pharmacology**, v9, 2017:31-45.

PAPPA, K.; VLACHOS, G.; ROUBELAKIS, M.G.; ANAGNOU, N. Low mutational burden eight genes involved in the MAPK/ERK, PI3K/AKT, and GNAQ/11 pathways in female genital tract primarz melanomas. *Biomed Research International*, 2015.

PAPPA, K.; VLACHOS, G.; ROUBELAKIS, M.G.; ANAGNOU, N. Low mutational burden eight genes involved in the MAPK/ERK, PI3K/AKT, and GNAQ/11 pathways in female genital tract primarz melanomas. **Biomed Research International**, v2015, 2015:1-10 .

PARKS, W.C.; WILSON, C.L.; LOPEZ-BOADO, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v4, 2004: 617–629

PEI, D. AND S.J. WEISS, Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v271(15), 1996: 9135-9140.

PERRONE, D.; ARDITO, F.; GIANNATEMPO, G.; DIOGUARDI, M.; TROIANO, G.; RUSSO, L.L.; LILLO, A.D.; LAINO, L.; MUZIO, L.L. Biological and therapeutic activities, and anticâncer properties of curcumin. **Experimental and therapeutic medicine**, v10(5), 2015:1615-1623.

PERRONE, D.; ARDITO, F.; GIANNATEMPO, G.; DIOGUARDI, M.; TROIANO, G.; RUSSO, L.L.; LILLO, A.D.; LAINO, L.; MUZIO, L.L. Biological and therapeutic activities, and anticâncer properties of curcumin. **Experimental and therapeutic medicine**, v10(5), 2015:1615-1623.

PRIYADARSINI, K.I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agente. **Molecules**, v19(12), 2014 : 20091 – 20112.

PRIYADARSINI, K.I. The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agente. **Molecules**, v19(12), 2014 : 20091 – 20112.

PULUKURI, S. M.; PATIBANDLA, S.; PATEL, J.; ESTES, N.; RAO, J. S. Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors. **Oncogene**, v26, 2007: 5229–5237.

QUAN, T.; LITTLE, E.; QUAN, H.; VOORHEES, J.J.; FISHER, G.J. Elevated Matrix metalloproteinases and collagen fragmentation in photodamaged human skin: impact of altered extracellular matrix microenvironment on dermal fibroblast function. **Journal of Investigative Dermatology**, v133 (5), 2013: 1362-1366.

QUINCOCES SUAREZ J, RANDO DG, SANTOS RP, GONÇALVES CP, FERREIRA E, CARVALHO J, KOHN L, MARIA DA, FAIÃO-FLORES F, MICHALIK D, MARCUCCI MC, VOGEL C. New antitumoral agents I: in vitro anticancer activity and in vivo acute toxicity of synthetic 1,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one and derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v18, 2010: 6275–6281.

QUINCOCES, Suarez J., RANDO D.G., MARIA, D. A., PARDI, P., MARTINS, C., DE SOUZA, P. Brazilian patente PI 0602640-0. PCT/BR2007/ 000175. WO2008/003155. 2007 Jul 6.

QUINCOCES, Suarez J., RANDO D.G., SANTOS R.P., GONCALVES C. P., FERREIRA, E., CARVALHO, J., KOHN, L., MARIA, D. A., FAIÃO-FLORES F., MICHALIK, D., MARCUCI, M.C., VOGEL, C. New antitumoral agentes I: In vitro anticâncer activity and acute in vivo toxicity of synthetic 1,5-bis (4-hydroxy- 3- methoxyphenyl)-1,4- pentadien-3-one and derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v18, 2010: 6275-6281.

RAJABI, M.; MOUSA, S.A. the role of Angiogenesis in cancer treatment. **Biomedicines**, v5(2), 2017: 34-46.

RAM, M.; SHOENFELD, Y. Harnessing autoimmunity (vitiligo) to treat melanoma: a myth or reality? **Annals of the New York Academy of Science**, v1110, 2007: 410-425.

RAMOS-DESIMONE, N.; HAHN-DANTONA, E.; SIPLEY, J.; NAGASE, H.; FRENCH, D.L.; QUIGLEY, J.P. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. **The Journal of Biological Chemistry**, v274 (19), 1999: 13066-13076.

RASTOGI, P. Emergence of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: A therapeutic insight with literature review. **Dental research Journal (Isfahan)**, v9 (3), 2012: 239-244.

REDMAN, J.M.; GIBNEY, G.T.; ATKINS, M.B. Advances in immunotherapy for melanoma. **BMC Medicine**, v14, 2016: 20-31.

REDONDO, P.; LLORET, P.; IDOATE, M.; INOGEST, S. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. **Clinical and Experimental Dermatology**, v30(5), 2005: 541-545.

REMILLARD, T.C.; BRATSLAVSKY, G.; TAUBMAN-JENSEN, S.; STETLER-STENVENSON, W.G.; BOURBOULIA, D. Molecular mechanisms of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in the tumor microenvironment. **Molecular and Cellular Therapies**, v2, 2014: 17-24.

REMILLARD, T.C.; BRATSLAVSKY, G.; TAUBMAN-JENSEN, S.; STETLER-STENVENSON, W.G.; BOURBOULIA, D. Molecular mechanisms of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 in the tumor microenvironment. **Molecular and Cellular Therapies**, v2, 2014: 10-17.

ROBERT, C.; THOMAS, L.; BONDARENKO, I.; O'DAY, S.; WEBER, J.; GARBE, C.; LEBBE, C.; BAURAIN, J.F.; TESTORI, A.; GROB, J.J.; DAVIDSON, N.; RICHARDS, J.; MAIO, M.; HAUSCHILD, A.; MILLER, W.H. Jr; GASCON, P.; LOTEM, M.; HARMANKAYA, K.; IBRAHIM, R.; FRANCIS, S.; CHEN, T.T.; HUMPHREY, R.; HOOS, A.; WOLCHOK, J.D. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v364 (26), 2011: 2517-2526.

ROESCH, A. Tumor heterogeneity and plasticity as elusive drivers for resistance to MAPK pathway inhibition in melanoma. **Oncogene**, v34 (23), 2014: 1-7.

ROMANO E, PRADERVAND S, PAILLUSSON A, WEBER J, HARSHMAN K, MUEHLETHALER, K.; SPEISER, D.; PETERS, S.; RIMOLDI, D.; MICHELIN, O. Identification of multiple mechanisms of resistance to vemurafenib in a patient with BRAFV600E-mutated cutaneous melanoma successfully rechallenged after progression. **Clinical Cancer Research**, v19, 2013: 5749–5757.

ROOMI, M.W.; MONTERREY, J.C.; KALINOVSKYI, T.; RATH, M.; NIEDZWIECKI, A. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cell lines. **Oncology reports**, v21, 2009: 1323-1333.

ROTTE, A. ; MARTINKA, M.; LI, G. MMP-2 expression is a prognostic marker for primary melanoma patients. **Cellular Oncology**, v35 (3), 2012:207-216.

SAGAR, J.; CHAIB, B.; SALES, K.; WINSLET, M.; SEIFALIAN, A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. **Cancer cell international**, v 7, 2007: 9-20.

SANCHEZ-LAORDEN, B.; VIROS, A.; GIROTTI, M.R.; PEDERSEN, M.; SATURNO, G.; ZAMBON ,A.; , NICULESCU-DUVAZ, D.; TURAJLIC, S., HAYES, A., GORE, M.; LARKIN, J.; LORIGAN, P.; COOK, M.; SPRINGER, C.; MARAIS, R.

SANDRI, S.; FAIAO-FLORES, F.; TIAGO, M.; PENNACCHI, P.C.; MASSARO, R.R.; ALVES-FERNANDES, D.K.; BERARDINELLI, G.N.; EVANGELISTA, A.F.; DE LIMA VAZQUEZ, V.; REIS, R.M.; MARIA-ENGLER, S.S. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. **Pharmacological Research**, v111, 2016: 523-533.

SATO, H.; TAKINO, T.; MIYAMORI, H. Roles of membrane type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. **Cancer Science**, v96 (4), 2005, 212-217.

SATO, H.; TAKINO, T.; MIYAMORI, H. Roles of membrane type matrix metalloproteinase-1 in tumor invasion and metastasis. **Cancer Science**, v96 (4), 2005: 212-217.

SAUNDERS, W.B.; BAYLESS, K.J.; DAVI, G.E. MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices. **Journal of Cell Science**, v118(Pt10), 2005: 2325-2340.

SAUNDERS, W.B.; BAYLESS, K.J.; DAVI, G.E. MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices. **Journal of Cell Science**, v118 (Pt 10), 2005: 2325-2340.

SCHATTON, T.; MURPHY, G.F.; FRANK, N.Y.; YAMAURA, K.; WAAGA-GASSER, A.M.; GASSER, M.; ZHAN, Q.; JORDAN, S.; DUNCAN, L.M.; WEISHAUPT, C.; FUHLBRIGGE, R.C.; KUPPER, T.S.; SAYEGH, M.H.; FRANK, M.H. Identification of cells initiating human melanomas. **Nature**, v45 (7176), 2008, 345-349.

SCHATTON, T.; MURPHY, G.F.; FRANK, N.Y.; YAMAURA, K.; WAAGA-GASSER, A.M.; GASSER, M.; ZHAN, Q.; JORDAN, S.; DUNCAN, L.M.; WEISHAUPT, C.; FUHLBRIGGE, R.C.; KUPPER, T.S.; SAYEGH, M.H.; FRANK, M.H. Identification of cells initiating human melanomas. **Nature**, v451 (7176), 2008: 345-352.

SELA-PASSWELL, N.; KIKKERI, R.; DYM, O.; ROZENBERG, H.; MARGALIT, R.; ARAD-YELLIN, R.; EISENSTEIN, M.; BRENNER, O.; SHOHAM, T.; DANON T.; SHANZER, A.; SAGI, I. Antibodies targeting the catalytic zinc complex of activated matrix metalloproteinases show therapeutic potential. **Nature Medicine**, v18, 2011: 143–147.

SELVENDIRAN, K.; TONG, L.; VISHWANATH, S.; BRATASZ, A.; TRIGG, N.; KUTALA, V.; HIDEK, K.; KUPPUSAMY, P. EF24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v282 (39), 2007:28609-28618

SHAVERDASHVILI, K., WONG, P.; MA, J.; ZHANG, K.; OSMAN, I.; BEDOGNI, B. MT1-MMP modulates melanoma cell dissemination and metastasis through activation of MMP2 and RAC1. **Pigment Cell Melanoma Research**, 27(2), 2014: p. 287-296.

SHAVERDASHVILI, K.; ZHANG, K.; OSMAN, I.; HONDA, K.; JOBAVA, R.; BEDOGNI, B.. MT1-MMP dependent repression of the tumor suppressor SPRY4 contributes to MT1-MMP driven melanoma cell motility. **Oncotarget**, v6(32), 2015: 33512-22.

SHI H, MORICEAU G, KONG X, KOYA RC, NAZARIAN R, PUPO GM, BACCHIOCCHI, A.; DAHLMAN, K.B.; CHMIELOWSKI, B.; SOSMAN, J.A.; HALABAN, R.; KEFFORD, R.F.; LONG, G.V.; RIBAS, A.; LO, R.S. Preexisting MEK1 exon 3 mutations in V600E/KBRAF melanomas do not confer resistance to BRAF inhibitors. **Cancer Discovery**, v2, 2012: 414–424.

SHI H, MORICEAU G, KONG X, LEE MK, LEE H, KOYA RC, NG, C.; CHODON, T.; SCOLYER, R.A.; DAHLMAN, K.B.; SOSMAN, J.A.; KEFFORD, R.F.; LONG, G.V.; NELSON, S.F.; RIBAS, A.; LO, R.S. Melanoma whole-exome sequencing identifies

(V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. **Nature Communications**, v3, 2012:724-741.

SHI, H.; HUGO, W.; KONG, X.; HONG, A.; KOYA, R.C.; MORICEAU, G.; CHODON, T.; GUO, R.; JOHNSON, D.B.; DAHLMAN, K.B.; KELLEY, M.C.; KEFFORD, R.F.; CHMIELOWSKI, B.; GLAPSY, J.A.; SOSMAN, J.A.; VAN BAREN, N.; LONG, G.V.; RIBAS, A.; LO, R.S. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. **Cancer Discovery**, v4(1), 2014: 80-93.

SHTUTMAN, M.; ZHURINSKY, J.; SIMCHA, I.; ALBANESE, C.; D'AMICO, M.; PESTELL, R.; BEN-ZE'EV, A. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/lef-1 pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v96, 1996: 5522–5527.

SIMONETTI, O.; LUCARINI, G.; BRANCORSINI, D.; NITA, P.; BERNARDINI, M.L.; BIAGINI, G.; OFFIDANI, A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. **Cancer**, v95, 2002:1963–1970.

SINGH, A.K.; SIDHU, G.S.; DEEPA, T.; MAHESHWARI, R.K. Curcumin inhibits the proliferation and cell cycle progression of human umbilical vein endothelial cell. **Cancer Letters**, v107, 1996: 109-115.

SONI, K.; KUTTAN, R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. **Indian Journal of Physiology .Pharmacology**, v36, 1992: 273–275.

SOSMAN, J.A.; KIM, K.B.; SCHUCHTER, L.; GONZALEZ, R.; PAVLICK, A.C.; WEBER, J.S.; MCARTHUR, G.A.; HUTSON, T.E.; MOSCHOS, S.J.; FLAHERTY, K.T.; HERSEY, P.; KEFFORD, R.; LAWRENCE, D.; PUZZANOV, I.; LEWIS, K.D.; AMARAVADI, R.K.; CHMIELOWSKI, B.; LAWRENCE, H.J.; SHYR, Y.; YE, F.; LI, J.; NOLOP, K.B.; LEE, R.J.; JOE, A.K.; RIBAS, A. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. **The New England Journal of Medicine**, v366(8), 2012:707-714.

SPAGNOLO, F.; GHIORZO, P.; QUEIROLO, P. Overcoming resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutated metastatic melanoma. **Oncotarget**, v5(21), 2014: 10206-10221.

STAHL, J.M.; SHARMA, A.; CHEUNG, M.; ZIMMERMAN, M.; CHENG, J.Q.; BOSENBERG, M.W.; KESTER, M.; SANDIRASEGARANE, L.; ROBERTSON, G.P. Deregulated AKT3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer Research**, v64, 2004: 7002–7010.

STETLER-STEVENSON, W.G.; GAVIL, N.V. Normalization of the tumor microenvironment: evidence for tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a cancer therapeutic. **Connective tissue research**, v55 (1), 2014: 13-19.

STETLER-STEVENSON, W.G.; GAVIL, N.V. Normalization of the tumor microenvironment: evidence for tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a cancer therapeutic. **Connective tissue research**, v55 (1), 2014 : 13-19.

SUN ZJ, CHEN G, ZHANG W, HU X, LIU Y, ZHOU Q, ZHU LX, ZHAO YF. Curcumin dually inhibits both mammalian target of rapamycin and nuclear factor- κ B pathways through a crossed phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/I κ B kinase complex signaling axis in adenoid cystic carcinoma. **Molecular Pharmacology**, v79(1), 2011:106-118.

TEFANY, F.J.; BARNETSON, R.S.; HALLIDAY, G.M.; MCCARTHY, S.W.; MACCARTHY, W.H. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in primary regressing and non regressing malignant melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v97 (2), 1991: 197-202.

TENNESEN, H.H., GREENHILL, V. Studies on curcumin and curcuminoids. XXII: Curcumin as a reducing agente and as a radical scavenger. **International Journal of Pharmaceutics** v87, 1992: 79-87.

THAKUR, V.; BEDOGNI, B. The membrane tethered matrix metalloproteinase MT1-MMP at the forefront of melanoma cell invasion and metastasis. **Pharmacology Research**, v111, 2016: 17-22.

THOMAS, S.L.; ZHONG, D.; ZHOU, W.; MALIK, S.; LIOTTA, D.; SNYDER, J.P.; HAMEL, E.; GIANNAKAKOU, P. EF24, a novel curcumin analog, disrupts the microtubule cytoskeleton and inhibits HIF-1. **Cell Cycle**, v 7(15), 2008: 2409-2417.

TIAGO, M.; OLIVEIRA, E.M.; BROHEM, C.A.; PENNACCHI, P.C.; PAES, R.D.; HAGA, R.B.; CAMPA, A.; BARROS, S.B.M.; SMALLEY, K.S.; MARIA-ENGLER, S.S. Fibroblasts protect melanoma cells from the cytotoxic effects of doxorubicin. **Tissue Engineering: Part A**, v20 (17-18), 2014: 2412-2421.

TIMA, S.; ICHIKAWA, H.; AMPASAVATE, C.; OKONOGLI, S.; ANUCHAPREEDA, S. Inhibitory effect of turmeric curcuminoids on FLT3 expression and cell cycle arrest in the FLT3- Overexpressing Eol-1 Leukemic cell line. **Journal of Natural Products**, v77(4), 2014: 948-954.

TONDER, A.; JOUBERT, A.M.; CROMARTY, A.D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **BMC Res Notes**, v8, 2015: 47-57.

TONG, W.; WANG, Q.; SUN, D.; SUO, J. Curcumin suppresses colon cancer cell invasion via AMPK-induced inhibition of NF- κ B, uPA activator and MMP-9. **Oncology Letters**, v12(5), 2016: 4139-4146.

TOPALIAN, S.L.; HODI, F.S.; BRAHMER, J.R.; GETTINGER, S.N.; SMITH, D.C.; MCDERMOTT, D.F.; POWDERLY, J.D.; CARVAJAL, R.D.; SOSMAN, J.A.; ATKINS, M.B.; LEMING, P.D.; SPIGEL, D.R.; ANTONIA, S.J.; HORN, L.; DRAKE, C.G.; PARDOLL, D.M.; CHEN, L.; SHARFMAN, W.H.; ANDRES, R.A.; TAUBE, J.M.;

MCMILLER, T.L.; XU, H.; KORMAN, A.J.; JURE-KUNKEI, M.; AGRAWAL, S.; MCDONALD, D.; KOLLIA, G.D.; GUPTA, A.; WIGGINTON, J.M.; SZNOL, M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **The New England Journal of Medicine**, v366(26), 2012: 2443-2454.

TOPALIAN, S.L.; SZNOL, M.; MCDERMOTT, D.F.; KLUGER, H.M.; CARVAJAL, R.D.; SHARFMAN, W.H.; BRAHMER, J.R.; LAWRENCE, D.P.; ATKINS, M.B.; POWDERLY, J.D.; LEMING, P.D.; LIPSON, E.J.; PUZANOV, I.; SMITH, D.C.; TAUBE, J.M.; WIGGINTON, J.M.; KOLLIA, G.D.; GUPTA, A.; PARDOLL, D.M.; SOSMAN, J.A.; HODI, F.S. Survival, durable tumor remission and long term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. **Journal of Clinical Oncology**, v32(10), 2014: 1020-1030.

TSAO, H.; ROGERS, G.S.; SOBER, A.J. An estimate of the annual direct cost of treating cutaneous melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v38 (5pt1), 1998: 669-680.

VAAN DEN OORD, J.J.; PAEMEM, L.; OPDENAKKER, G.; DE WOLF-PEETERS, C. Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin. **American Journal of Pathology**, v151, 1997: 665–70

VALENTE, P.; FASSINA, G.; MELCHIORI, A.; MASIELLO, L.; CILLI, M.; VACCA, A.; ONISTO, M.; SANTI, L.; STETLER-STEVENSON, W.G.; ALBINI, A. TIMP-2 overexpression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. **International Journal Cancer**, 1998, v75 (2):246-253.

VALENTE, P.; FASSINA, G.; MELCHIORI, A.; MASIELLO, L.; CILLI, M.; VACCA, A.; ONISTO, M.; SANTI, L.; STETLER-STEVENSON, W.G.; ALBINI, A. TIMP-2 overexpression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. **International Journal Cancer**, v75 (2), 1998:246-253.

VAN ALLEN, E.M.; WAGLE, N.; SUCKER, A.; TREACY, D.J.; JOHANNESSEN, C.M.; GOETZ, E.M. PLACE CS, TAYLOR-WEINER A, WHITTAKER S, KRYUKOV GV, HODIS E, ROSENBERG M, MCKENNA A, CIBULSKIS K, FARLOW D, ZIMMER L, HILLEN U, GUTZMER R, Goldinger SM, UGUREL S, GOGAS HJ, EGBERTS F, BERKING C, TREFZER U, LOQUAI C, WEIDE B, HASSEL JC, GABRIEL SB, CARTER SL, GETZ G, GARRAWAY LA, SCHADENDORF D. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. **Cancer Discovery**, v4, 2014: 94–109.

VAN HINSBERGH, V. W. M.; KOOLWIJK, P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. **Cardiovascular research**, v 78 (2) 2007:203-212.

VAN HINSBERGH, V. W. M.; KOOLWIJK, P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. **Cardiovascular research**, v 78 (2), 2007:203-212.

VIHINEN, P.; KOSKIVUO, I.; SYRJANEN, K.; TERVAHARTIALA, T.; SORSA, T.; PYRHONEN, S. Serum matrix metalloproteinase-8 is associated with ulceration and vascular invasion of malignant melanoma. **Melanoma Research**, v18, 2008: 268–273.

VISSE, R.; HIDEAKI, N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circulation Research**, v92, 2003: 827-839.

VISSE, R.; HIDEAKI, N. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circulation Research**, v92 (8), 2003: 827-839.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v10, 2004: 789-799.

VYAS, A.; DANDAWATE, P.; PADHYE, S.; AHIMAD, A.; SARKAR, F. Perspectives of new synthetic curcumin analogs and their potential anticancer properties. **Current Pharmaceutical Design**, v19(11), 2013: 2047-2069.

VYAS, A.; DANDAWATE, P.; PADHYE, S.; AHIMAD, A.; SARKAR, F. Perspectives of new synthetic curcumin analogs and their potential anticancer properties. **Current Pharmaceutical Design**, v19(11), 2013: 2047-2069.

VYAS, A.; DANDAWATE, P.; PADHYE, S.; AHMAD, A.; SARKAR, F. Perspectives on new synthetic curcumin analogs and their potential anticancer properties. **Current Pharmaceutical Design**, v19 (11), 2013: 2047-2069.

WAGLE, N.; EMERY, C.; BERGER, M.F.; DAVIS, M.J.; SAWYER, A.; POCHANARD, P.; KEHOE, S.M.; JOHANNESSEN, C.M.; MACCONAILL, L.E.; HAHN, W.C.; MEYERSON, M.; GARRAWAY, L.A. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. **Journal of Clinical Oncology**, v 29 (22), 2011: 3085-3096.

WANG, Y.; PAN, M.; CHENG, A.; LIN, L.; HO, Y.; HSIEH, C.; LIN, J. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis**, v15, 1997: 1867-1876.

WEAVER, A.M. Invadopodia: specialized cell structures of cancer invasion. **Clinical and Experimental Metastasis**, v23, 2006: 97–105.

WEBBER, J.S.; D'ANGELO, S.P.; MINOR, D.; HODI, S.; GUTZMER, R.; NEYNS, B.; HOELLER, C.; KHUSHALANI, N.; MILLER, W.H.; LAO, C.D.; LINETTE, G.P.; THOMAS, L.; LORIGAN, P.; GROSSMANN, K.F.; HASSEL, J.C.; MAIO, M.; SZNOL, M.; ASCIERTO, P.A.; MOHR, P.; CHMIELOWSKI, B.; BRYCE, A.; SVANE, I.M.; GROB, J.; KRACKHARDT, A.M.; HORAK, C.; LAMBERT, A.; YANG, A.S.; LARKIN, J. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (Checkmate 037) : a randomised, controlled, open label, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v16 (4), 2015: 375-384.

WHITEMAN, D. C.;WHITEMAN, C.A.; GREEN, A.C.Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. **Cancer Causes Control**,v 12, 2001: 69–82.

WIDLUND, H.R.; HORSTMANN, M.A.; PRICE, E.R.; CUI, J.; LESSNICK, S.L.; WU, M.; HE, X.; FISHER, D.E. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target microphthalmia-associated transcription factor. **The Journal of Cell Biology**., v158, 2002:1079–1087.

WOLCHOK, J.D.; CHIARION-SILENI, V.; GONZALEZ, R.; RUTKOWSKI, P.; GROB, J.J.; COWEY, C.L.; LAO, C.D.; WAGSTAFF, J.; SCHADENDORF, D.; FERRUCI, P.F.; SMYLLIE, M.; DUMMER, R.; HILL, A.; HOGG, D.; HAANEN,J.; CARLINO, M.S.; BECHTER, O.; MAIO, M.; MARQUEZ-RODAS, I.; GUIDOBONI, M.; MCARTHUR, G.; LEBBÉ, C.; ASCIERTO, P.A; LONG, G.V.; CEBON, J.; SOSMAN, J.; POSTOW, M.A.; CALLAHAN, M.K.;WALKER, D.; ROLLIN, L.; BHOORE, R.; HODI, R.S.; JARKIN, J. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v377(4), 2017: 1345-1356.

WOLCHOK, J.D.; CHIARION-SILENI, V.; GONZALEZ, R.; RUTKOWSKI, P.; GROB, J.J.; COWEY, C.L.; LAO, C.D.; WAGSTAFF, J.; SCHADENDORF, D.; FERRUCI, P.F.; SMYLLIE, M.; DUMMER, R.; HILL, A.; HOGG, D.; HAANEN,J.; CARLINO, M.S.; BECHTER, O.; MAIO, M.; MARQUEZ-RODAS, I.; GUIDOBONI, M.; MCARTHUR, G.; LEBBÉ, C.; ASCIERTO, P.A; LONG, G.V.; CEBON, J.; SOSMAN, J.; POSTOW, M.A.; CALLAHAN, M.K.;WALKER, D.; ROLLIN, L.; BHOORE, R.; HODI, R.S.; JARKIN, J. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v377(14), 2017:1345-1356.

WU, H.; GOEL, V.; HALUSKA, F.G. *PTEN* signaling pathways in melanoma. **Oncogene** , v22, 2003: 3113–3122.

WU, K.P.; LI, Q.; LIN, F.X.; LI, J.; WU, L.M.; LI, W.; YANF, Q.Z. MT1-MMP is not a good prognosticator of cancer survival: evidence from 11 studies. **Tumour Biology**, v35 (12), 2014: 12489-12495.

XIA, Y.; WEI, X.; LI, W.; KANCHANA, K.; XU, C.; CHEN, D.; CHOU, P.; JIN, R.; WU, J.; LIANG, G. Curcumin analogue A501 induces G2/M arrest and apoptosis in non –small cell lung cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v15 (16), 2014: 6893-6898.

YIN, D.; LIANG, Y.; ZHENG, T.; SONG, R.; WANG, J.; SUN, B.; PAN, S.; QU, L.; LIU, J.; JIANG, H.; LIU, L. EF24 inhibits tumor growth and metastasis via suppressing NF-kappaB dependent pathways in human cholangiocarcinoma. **Scientific Reports**, v6, 2016:

YODKEEREE, S.; GARBISA, S.; LIMTRAKUL, P. Tetrahydrocurcumin inhibits HT1080 cell migration and invasion via downregulation of MMPs and uPA. **Acta Pharmacoica Sinica**., v29 (7), 2008: 853-860.

ZEYNEP, E.; RIBAS, A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Therapeutic Advances Medical Oncology*, v8(1), 2016:48-56.

7. ANEXOS

7.1. Publicações

OLIVEIRA, E.A.; LIMA, D.S.; CARDOZO, L.E.; SOUZA, G.F.; DE SOUZA, N.; ALVES-FERNANDES, D.K.; FAIÃO-FLORES, F.; QUINCOCES, J.A.P.; BARROS, S.B.M.; NAKAYA, H.I.; MONTEIRO, G.; MARIA-ENGLER< S.S. Toxicogenomic and bioinformatics platforms to identify key molecular mechanisms of a curcumin-analogue DM-1 toxicity in melanoma Cells. **Pharmacological Research**, v125 (Pt B), 2017: 178-187.

7.2. Currículo Lattes

Nayane de Souza

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3155085211102675>
Última atualização do currículo em 31/10/2016

Bacharel em ciência e tecnologia pela Universidade Federal do ABC, realizou estágio no departamento de química orgânica na Universität Rostock, Alemanha e participou do programa Ciências Sem Fronteiras na Technische Universität Kaiserslautern, Alemanha, onde desenvolveu projetos de pesquisa no departamento de bioquímica. Atualmente é aluna de mestrado pelo departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Nayane de Souza
Nome em citações bibliográficas	Nayane de Souza; DE SOUZA, NAYANE

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2015	Mestrado em andamento em Ciências Farmacêuticas (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Inibição do potencial invasivo de linhagens de melanoma resistentes a Vemurafenib em modelo de pele reconstruída quando tratadas com o análogo da curcumina DM-1., Orientador: Silvy Stuchi Maria-Engler. Coorientador: Fernanda Faião Flores. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2008 - 2014	Graduação em Bacharelado em ciência e tecnologia. Universidade Federal do ABC, UFABC, Brasil.
2012 - 2013	Graduação em Chemie. Technische Universität Kaiserslautern, TU/Kaiserslautern, Alemanha. com período sanduíche em Ciências Sem Fronteiras (Orientador: Ciências Sem Fronteiras). Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.	
Vínculo institucional	
2014 - 2015	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20
Technische Universität Kaiserslautern, TU/Kaiserslautern, Alemanha.	
Vínculo institucional	
2013 - 2013	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 20
Universität Rostock, UNI/Rostock, Alemanha.	
Vínculo institucional	
2011 - 2012	Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Universidade Federal do ABC, UFABC, Brasil.

Vínculo institucional

2009 - 2009

Outras informações

Vínculo institucional

2009 - 2009

Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora de disciplina, Carga horária: 10
Monitora da disciplina "Bases computacionais da ciência"

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitora de disciplina, Carga horária: 10,
Regime: Dedicção exclusiva.
Monitora da disciplina "Transformações químicas"

Projetos de pesquisa

2014 - Atual	<p>Estudo da inibição do potencial invasivo de linhagens de melanoma resistentes ao Vemurafenibe quando tratadas com o análogo da curcumina DM-1. Descrição: Avaliação do processo de invasão das linhagens de melanoma resistentes ao vemurafenibe, frente ao tratamento com DM-1, por meio de ensaios de viabilidade celular e expressão de marcadores relacionados com o processo de invasão. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) .</p> <p>Integrantes: Nayane de Souza - Coordenador / Fernanda Faião-Flores - Integrante / Silvy Stuchi Maria-Engler - Integrante. Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa. Análise de diferentes mutantes da proteína MBP (maltose-binding protein) usando espectroscopia de ressonância paramagnética. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p>
2013 - 2013	<p>Integrantes: Nayane de Souza - Coordenador / Wolfgang E. Trommer - Integrante. Estudo do chaperone Sec B usando espectroscopia de ressonância paramagnética. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p>
2013 - 2013	<p>Integrantes: Nayane de Souza - Coordenador / Wolfgang E. Trommer - Integrante. Estudo do chaperone Sec B usando espectroscopia de ressonância paramagnética. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p>
2011 - 2012	<p>Integrantes: Nayane de Souza - Coordenador / Wolfgang E. Trommer - Integrante. Síntese de derivados de 7-Azaindole utilizando diferentes aldeídos (aromáticos, alifáticos e heterocíclicos), N-substitutos 2-amino ? 4- cyanopyrroles e vários metilenos ativos. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .</p>
2010 - 2011	<p>Integrantes: Nayane de Souza - Coordenador / Viktor Iaroshenko - Integrante / Marcelo Vilches-Herrera - Integrante. Espectroscopia eletrônica e espectrometria de massas aplicadas a moléculas poliatômicas halogenadas. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p>
2010 - 2011	<p>Integrantes: Nayane de Souza - Integrante / Alexandre Figueiredo Lago - Coordenador. Experimentação no ensino de química Descrição: Desenvolvimento de atividades experimentais que valorizassem o ensino de química construtivista a alunos de ensino médio.. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (5) .</p> <p>Integrantes: Nayane de Souza - Coordenador / Maisa Helena Altarugio - Integrante.</p>

Idiomas

Inglês

Alemão

Espanhol

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Pouco.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. ★ VILCHES-HERRERA, MARCELO ; KNEPPER, INGO ; **DE SOUZA, NAYANE** ; VILLINGER, ALEXANDER ; SOSNOVSKIKH, VYACHESLAV YA. ; IAROSHENKO, VIKTOR O. . One-Pot, Three-Component Synthesis of 7-Azaindole Derivatives from N-Substituted 2-Amino-4-cyanopyrroles, Various Aldehydes, and Active Methylene Compounds. ACS Combinatorial Science, v. 14, p. 434-441, 2012.

Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 15 | **SCOPUS** 19

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Evaluation of invasive potential inhibition in vemurafenib-resistant melanoma cell lines after DM-1 treatment. 2015. (Simpósio).
2. III Workshop Internacional de Eletroforese Capilar e Tecnologia de Microchip. I Encontro de Cromatografia Líquida. 2014. (Seminário).
3. XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. EVALUATION OF ANTIMETASTATIC ACTIVITY IN VEMURAFENIB-RESISTANT MELANOMA CELL LINES AFTER DM-1 TREATMENT (menção honrosa). 2014. (Encontro).
4. Dealing Successfully with conflicts (intercultural communication). Intercultural communication. 2012. (Seminário).
5. II Reunião Geral do Programa Institucional de Iniciação à Docência. Experimentação no ensino de química. 2010. (Outra).
6. 5º Simpósio de Base Experimental das Ciências Naturais. Crescimento de plantas induzido por iluminação artificial do tipo LED (Diodo Emissor de Luz) e Skywhite (Luz do dia). 2008. (Simpósio).

Educação e Popularização de C & T

Artigos

Artigos completos publicados em periódicos

1. ★ VILCHES-HERRERA, MARCELO ; KNEPPER, INGO ; **DE SOUZA, NAYANE** ; VILLINGER, ALEXANDER ; SOSNOVSKIKH, VYACHESLAV YA. ; IAROSHENKO, VIKTOR O. . One-Pot, Three-Component Synthesis of 7-Azaindole Derivatives from N-Substituted 2-Amino-4-cyanopyrroles, Various Aldehydes, and Active Methylene Compounds. ACS Combinatorial Science, v. 14, p. 434-441, 2012.

Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 15 | **SCOPUS** 19

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 23/06/2017 às 13:03:58

Imprimir currículo

7.3. Ficha do aluno

26.7.2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9143 - 9112492/1 - Nayane de Souza

Email: nayane@usp.br
Data de Nascimento: 06/07/1989
Cédula de Identidade: RG - 45.755.874-X - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Ciências e Tecnologia - Universidade Federal do ABC - São Paulo - Brasil - 2015

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Toxicologia
Data de Matrícula: 09/02/2015
Início da Contagem de Prazo: 09/02/2015
Data Limite para o Depósito: 09/08/2017
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Fernanda Faião Flores - 10/08/2016 até o presente. Email: fernandafaião@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvy Stuchi Maria Engler - 10/08/2016 até o presente. Email: silvy@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 09/02/2015
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/03/2016
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 09/02/2015

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 19/07/2017

Impresso em: 26/07/2017 15:53:03

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

26.7.2017

9143 - 9112492/1 - Nayane de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-12/2	Tópicos em Análises Clínicas I	03/03/2015	16/06/2015	15	1	100	A	N	Concluída
BMH5747-8/4	Tópicos Avançados em Biologia Celular e Tecidual I (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	11/03/2015	23/06/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5757-6/2	Tópicos em Análises Clínicas II	04/08/2015	16/11/2015	15	1	100	A	N	Concluída
MAE5755-7/2	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)	10/08/2015	27/11/2015	120	8	92	B	N	Concluída
BMH5749-9/5	Tópicos Avançados em Biologia Celular e Tecidual II (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	19/08/2015	04/11/2015	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
FBC5748-4/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	05/04/2016	17/05/2016	60	4	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

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 19/07/2017

Impresso em: 26/07/2017 15:53:03