PRISCILA FERREIRA DE MORAIS

NADPH Oxidase Nox1 do hospedeiro contribui para a manutenção do microambiente redox e crescimento do melanoma

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

PRISCILA FERREIRA DE MORAIS

NADPH Oxidase Nox1 do hospedeiro contribui para a manutenção do microambiente redox e crescimento do melanoma

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: farmacologia

Orientadora: Profª. Dra. Lucia Rossetti Lopes

Versão Original

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscila Ferreira de Morais

Título da Dissertação/Tese: NADPH Oxidase Nox1 do hospedeiro contribui para a manutenção do microambiente redox e crescimento do melanoma.

Orientador: Dra. Lucia Rossetti Lopes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Butantã São Paulo SP Av Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***O Papel da proteína dissulfeto isomerase (PDI) na progressão do melanoma***", registrado sob o protocolo nº ***120/2017***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em ***22/01/2018*** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) *Lucia Rossetti Lopes***
- Departamento: *Farmacologia*
- Membros da Equipe: *Priscila Ferreira de Morais (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico *ww2.icb.usp.br/icb/ceua*. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***The role of protein disulfide isomerase (PDI) in melanoma progression***", protocol nº ***120/2017***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on ***1/22/2018*** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) *Lucia Rossetti Lopes***
- Team members: *Priscila Ferreira de Morais (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	*C57BL/6 (OGM)*	*Fêmea/female*	*6-8 semanas/weeks*	*60*
	FVB	*Fêmea/female*	*6-8 semanas/weeks*	*60*
	FVB	*Fêmea/female*	*6-8 semanas/weeks*	*60*
	C57BL/6	*Fêmea/female*	*6-8 semanas/weeks*	*60*

São Paulo, 02 de fevereiro de 2018.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A professora Lucia Rossetti Lopes, orientadora desta dissertação. Obrigada pelo apoio e pela oportunidade de ampliar os meus horizontes no âmbito científico e acadêmico.

Ao professor João Agostinho Machado Neto, que me ofereceu apoio e conhecimento. Meu exemplo de pesquisador.

A minha família e esposo pela força e compreensão nos momentos difíceis desta caminhada.

Aos técnicos de laboratório Sidney Verissimo Filho e Adilson Silva Alves que me ensinaram as técnicas de laboratório e ofereceram conhecimento.

As minhas amigas de ICB Ailma Oliveira, Karina Cunha e Mariana de Mendonça, que me acolheram, me incentivaram e me ensinaram os primeiros passos quando cheguei e me sentia perdida.

Ao colega de ICB Guilherme Henrique Gatti da Silva que gentilmente me ajudou coma técnica de qPCR e por ter compartilhado um pouco do seu conhecimento comigo.

As todas as minhas colegas de laboratório especialmente à Marcella Liciani Franco e Stephany Beyerstedt com quem convivi mais tempo e compartilhei conversas e boas risadas.

A professora Ana Paula Lepique e sua aluna Gretel, pela colaboração nos experimentos de citometria de fluxo, fornecendo os insumos e compartilhando seus conhecimentos.

Aos colegas e funcionários do ICB-I, especialmente a Sandra do Biotério, Moacir, Mônica, Camila, o aluno Bruno, entre outros, que cruzaram minha jornada e me ofereceram conhecimento, palavras de conforto em momentos difíceis e boas conversas e risadas na copa.

A todos vocês, deixo o meu...

Muito Obrigada

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

MORAIS, PF. **NADPH Oxidase Nox1 do hospedeiro contribui para a manutenção do microambiente redox e crescimento do melanoma.** 2019,76f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Alterações no estado redox celular fazem parte de mecanismos que a célula utiliza para integrar informações e coordenar complexas vias de sinalização envolvidas na progressão tumoral. Vários estudos mostraram que espécies reativas de oxigênio geradas pela NADPH oxidase são essenciais para a proliferação e sobrevivência do melanoma. A expressão de Nox1 em células de melanoma promove o crescimento deste tumor. No entanto, o papel de Nox1 do hospedeiro no crescimento do melanoma ainda precisa ser melhor caracterizado. Diante disto, nosso trabalho teve por objetivo compreender o papel da Nox1 do hospedeiro no microambiente redox do melanoma. Para isto, utilizamos modelos, *in vivo*, de camundongos fêmeas C57Bl/6, com dez semanas de idade, do tipo selvagem (WT) e deficientes de Nox1 (Nox1-/-) nas quais foram inoculadas subcutaneamente células de melanoma murino B16F10. Após 15 dias da inoculação, os tumores foram removidos, medidos e pesados. A média do volume tumoral (n=12; média ± erro padrão) foi de 0,9619 ± 0,2241 cm^3 para os animais do grupo WT e 0,4181 ± 0,1303 para o grupo Nox1-/- ($P < 0.05$). As vias de crescimento dependentes de Nox1 foram analisadas no tumor. Entretanto não foram observadas alterações na ativação das vias de sinalização do EGFR e MAPK (ERK 1/2, p-38 MAPK e JNK), AKT, STAT3 e também nos marcadores de apoptoses (relação BCL2/BAX). A deficiência de Nox1 no hospedeiro levou a uma redução na produção de ROS que alterou o microambiente redox tumoral. Como resultado, verificamos, através do qPCR, níveis mais baixos de Nox1 e Nox4 nos melanoma de camundongos Nox1-/-. A deficiência de Nox1 do hospedeiro também afetou a proliferação celular do melanoma e reduziu a angiogênese tumoral, verificados por um aumento de p21, p27 e diminuição de ciclina E, indicando uma parada do ciclo celular em G1 e pela diminuição dos níveis de mRNA de VEFGA ($p <0,05$), respectivamente. Em conjunto, estas alterações causaram uma parada no crescimento do tumor. Considerando estudos que apontaram o envolvimento de Nox1 na diferenciação de células imunes e consequentemente crescimento tumoral, analisamos as populações

de células do infiltrado. No entanto, a análise de FACS, não mostrou que a deficiência de Nox1 no hospedeiro afeta as populações de macrófagos ou linfócitos. A partir de todos os resultados encontrados neste estudo, podemos concluir que Nox1 do hospedeiro é uma fonte importante de ROS para o microambiente tumoral. De fato, o crescimento do melanoma em um microambiente com deficiência de Nox1 foi menor. Portanto, propomos uma nova perspectiva para o tratamento do melanoma através do controle redox desta doença usando inibidores de Nox1.

Palavras-chave: Melanoma. NADPH oxidases. Nox1. Microambiente tumoral.

ABSTRACT

MORAIS, PF. **Host NADPH Oxidase Nox1 Contributes to Maintaining Redox Microenvironment and Melanoma Growth.** 2019.76f. Dissertation (Master in Pharmacology) - Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2019.

Changes in the cellular redox state is one mechanism by which the cell integrates information and coordinates complex signaling pathways involved in tumor progression. Several studies have demonstrated that reactive oxygen species generated by NADPH oxidase are essential for melanoma proliferation and survival.Nox1expression in melanoma cells promotes tumor growth. However, the role of host Nox1 in melanoma growth remains to be fully characterized. Therefore, our work aimed to understand the role of host Nox1 in the melanoma redox microenvironment. We used C57Bl/6 wild type (WT) and Nox1 lacking (Nox1-/-) mice in which we inoculated subcutaneously B16F10 murine melanoma cells. After 15 days of the inoculation, the tumors were removed, measured and weighed. The mean volume of tumor (n=12; mean ± S.E) was 0,9619 ± 0,2241 cm^3 for the WT group and 0,4181 ± 0,1303 for the Nox1-/- group ($p < 0.05$). Nox1 dependent growth pathways was determined in the tumor. No change in the activation of EGFR and MAPK signaling pathways (ERK 1/2, p-38 MAPK and JNK), AKT, STAT3, and also, BCL2/BAX ratio were observed. The host Nox1 deficiency led to a reduction in ROS production which changed the redox tumor microenvironment. As a result, we checked, through qPCR, lower levels of both Nox1 and of Nox4 in melanoma tumors from Nox1-/- mice. The host Nox1 deficiency also affected melanoma cell proliferation and reduced tumor angiogenesis verified by increased p21, p27, and reduced cyclin E, indicating G1 cell cycle arrest, and decreased VEFGA mRNA levels, ($p < 0.05$), respectively. Taken together it's, ultimately, causing a growth arrest in the tumor. Considering studies that pointed the involvement of Nox1 in immune cells differentiation and consequently tumor growth, we analyzed cell populations of the infiltrate. However, FACS analysis does not showed that host Nox1 deficiency affect macrophages or lymphocytes populations. As from all the results found in this study, we can conclude that host Nox1 is an important source of ROS to the tumor microenvironment. In fact, melanoma growth in a Nox1 deficient microenvironment was lower. Therefore, we proposes a new

perspective in melanoma treatment through the redox control of the disease using Nox1 inhibitors.

Key words: Melanoma. NADPH oxidases. Nox1. Tumor microenvironment.

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT - Proteína quinase B

AP-1 - Proteína ativadora-1

ATF-1 - Fator de transcrição ativado 1

CAFs - Fibroblastos associados ao câncer

CDK - Quinases dependente de ciclina

CDKI – Inibidor de quinase dependente de ciclina

CEs - Células endoteliais

DMSO – Dimetilsufóxido

DPI - Difenileno-iodônio

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico

EMT - Transição epitélio-mesenquimal

ERK 1/2 - Quinase regulada por sinal extracelular

FGF – Fator de crescimento dos fibroblastos

GSH – Glutationa

JNK - Quinase c-Jun amino-terminal

MEK - Quinase ativadora da MAP quinase

NADPH Oxidase - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina Oxidase

NF-kB - Fator de transcrição nuclear kappa B

NKT - Linfócitos T "natural killer”

PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas

PI3K- Fosfoinositídeo 3-quinase

p-38 - proteína quinase ativadas por mitógenos

Rac1 - Substrato da toxina botulínica relacionada a Ras1

RAF – proteína serina/treonina quinase (ARAF, BRAF, CRAF)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

STAT 1/3 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1/3

TCR – Receptores de linfócitos T

TGF-β Fator de crescimento tumoral beta

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Melanoma *16*
1.2 ROS e Sinalização Redox *18*
1.3. NADPH Oxidases *22*
1.3.1 Mecanismo de ativação da NADPH Oxidase 24
1.4 Status redox do Microambiente Tumoral *27*
1.5 NADPH oxidase e Melanoma *30*
2 OBJETIVO GERAL 32
2.1 Objetivos Específicos *32*
3 METODOLOGIA 33
3.1 Amostra *34*
3.2 Cultura de células B16F10 ..... *34*
3.3 Avaliação do crescimento tumoral *35*
3.4 Avaliação da expressão gênica nos animais deficientes de Nox1 por qPCR. *36*
3.5 Análise das vias de sinalização redox dependentes por Western Blotting *38*
3.6 Análise de angiogênese em animais deficientes de Nox1 ..... *40*
3.7 Análise de infiltrado Tumoral através de imunofenotipagem por citometria de fluxo. *41*
3. 8 Análise Estatística *43*
4 RESULTADOS 44
4.1 Nox1 do hospedeiro contribui para o crescimento tumoral do melanoma *44*
4.2 Nox1 do hospedeiro não interfere com a ativação da via do EGFR tumoral. *45*
4.3 Células B16F10 apresentam uma maior expressão de Nox1 ..... *46*
4.4 A deficiência de Nox1 do hospedeiro diminui a expressão gênica de Nox1 e Nox4 nos tumores de camundongos deficientes de Nox1 (Nox1-/-). *46*
4.5 A deficiência de Nox1 do hospedeiro não altera as populações de células do infiltrado tumoral em ambos os grupos. *47*
4.6 A deficiência de Nox1 do hospedeiro diminui a angiogênese tumoral *49*
4.7 A deficiência de Nox1 do hospedeiro promove parada do ciclo celular em G1. ..... *50*
4.8 A deficiência de Nox1 do hospedeiro não promove menor crescimento tumoral por apoptose. *52*
5 DISCUSSÃO 53
6 CONCLUSÃO 67

REFERÊNCIAS.....68

1 INTRODUÇÃO

Os diversos tipos de câncer estão entre as principais causas de morte, representando a segunda maior causa de mortes no mundo. A nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença (OPAS, 2018). De acordo com dados do Instituto Nacional do câncer (INCA), a estimativa para o Brasil, biênio 2018-2019, é que surjam cerca de 600 mil novos casos de câncer por ano, sendo, 170 mil destes, de câncer de pele não melanômico. Apesar do câncer de pele ser o mais comum, em homens e mulheres, no Brasil, correspondendo a 30% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa somente 3% das neoplasias malignas do órgão. É um tipo de câncer que tem baixa incidência, porém sua letalidade é elevada, e é grave devido sua alta possibilidade de metástase (INCA, 2018).

As células de melanoma, assim como outros tumores, apresentam sinalização redox alterada com níveis mais elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) do que o necessário para sinalização celular normal (ROUAUD et al., 2016). As ROS são um grupo de moléculas produzidas durante o metabolismo e também por enzimas, como as NADPH oxidases, que agem como moléculas sinalizadoras fundamentais em baixas concentrações. Os altos níveis de ROS, produzidos em células tumorigênicas, são benéficos para a tumorigênese e promovem vias de sinalização responsáveis pela proliferação, atividades metabólicas aberrantes e angiogênese (GWANGWA; JOUBERT; VISAGIE, 2018). O elevado nível de ROS em melanoma primário e metastático está associado a superexpressão de duas isoformas das enzimas NADPH oxidase (Nox): Nox1 e Nox4. Estudos demonstraram que a atividade de Nox1 e os níveis desta proteína aumentaram após exposição à radiação UV, nas células primárias de melanoma, e podem ser responsáveis pelo acúmulo de ROS nos nevos displásicos (ROUAUD et al., 2016; VENZA et al., 2015).

O elevado nível de ROS nas células tumorais pode promover a proliferação celular e, em muitos casos, pode ser acoplado à adaptações redox para promover a sobrevivência celular e resistência a drogas. Diante disto, a modulação redox no câncer vem sendo estudada como uma estratégia distinta que permitiria seletividade terapêutica e superar a resistência aos medicamentos. Existem duas estratégias terapêuticas redox opostas para o tratamento do câncer. Uma abordagem é o aumento da geração de ROS, tratando as células cancerígenas com agentes

farmacológicos com propriedades pró-oxidantes. Se o aumento de ROS atingir um certo nível limiar que é incompatível com a sobrevivência celular poderá exercer um efeito citotóxico, levando à morte de células malignas e, assim, limitando a progressão do câncer. A outra abordagem consiste em aumentar a capacidade de eliminação das ROS usando antioxidantes, interrompendo a sinalização de ROS, suprimindo o crescimento do tumor (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009).

Um estudo feito com a utilização de nanopartículas de cobre que promoveu o aumento de ROS, em melanoma subcutâneo de camundongo, demonstrou redução significativa do crescimento do tumor, inibição de metástase e aumentou a taxa de sobrevida dos animais. O aumento dos níveis de ROS provocados pelas nanopartículas gerou estresse oxidativo, e morte celular por apoptose (MISHRA et al., 2018). No entanto, sob estresse oxidativo intrínseco persistente, muitas células cancerígenas sofrem adaptação redox, aumentando a capacidade antioxidante intracelular, que pode ser conferida pelo GSH e tioredoxina em grande parte, tornando-se resistentes ao estresse e a certos agentes anticâncer (TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Por outro lado, estudos utilizando vários antioxidantes em ensaios clínicos, não se mostraram promissores como uma abordagem terapêutica para combater os mecanismos dependentes de ROS no câncer, pois seu uso foi associado ao aumento da incidência e progressão tumoral (BJELAKOVIC et al., 2007), inclusive no melanoma em camundongos (GAL et al., 2015). Esse efeito adverso dos antioxidantes pode estar relacionado à prevenção de danos oxidativos em tumores já estabelecidos e, portanto, promover a sobrevivência das células tumorais e inibição da apoptose mediada por ROS (HALLIWELL, 2000). Ademais, evidências experimentais mostram que os antioxidantes podem diminuir a atividade antitumoral mediada por ROS de agentes anticâncer, incluindo paclitaxel (ALEXANDRE et al., 2006) e radioterapia (BAIRATI et al., 2005).

A compreensão da modulação redox nas células tumorais e células do microambiente tumoral é complexa. A estratégia de reduzir as ROS utilizando antioxidantes é muito abrangente e inespecífica, tendo em vista que estes compostos podem interagir com diversas moléculas. O desenvolvimento de inibidores específicos de ROS tem se mostrado importante devido aos maus resultados das terapias baseadas em antioxidantes. Seguindo essa linha de estudos sobre a modulação redox no câncer como estratégia terapêutica para tratamento e superação da resistência

medicamentosa, nosso estudo irá investigar se a inibição específica de uma via produtora de ROS, Nox1 do hospedeiro, afetará a homeostase do microambiente redox tumoral, interferindo no crescimento tumoral do melanoma.

1.1 Melanoma

O melanoma é um câncer que têm origem nos melanócitos, células produtoras do pigmento melanina. Os melanócitos encontram-se como células individuais na camada basal da epiderme formando interações heterotípicas com queratinócitos vizinhos, as células mais abundantes da pele. A proliferação e ativação dos melanócitos é controlada por queratinócitos através de um sistema de fatores de crescimento parácrino e molécula de adesão celular. Os melanócitos normais produzem e subsequentemente transferem melanossomas, produtores de pigmento, para queratinócitos vizinhos, cuja função é proteger os queratinócitos dos efeitos prejudiciais da radiação UV (ultravioleta) (CICHOREK et al., 2013; DAMSKY; ROSENBAUM; BOSENBERG, 2011). A melanina liberada do melanossoma se acumula próximo ao núcleo celular para evitar que a luz UV promova danos ao DNA (MEYLE; GULDBERG, 2009). O melanoma surge de uma transformação maligna dos melanócitos, alterações moleculares e cromossômicas estão envolvidas na evolução do melanoma (CARLSON et al., 2005).

Os fatores de risco para o melanoma decorrem de uma interação entre suscetibilidade genética e a exposição ambiental. A radiação ultravioleta é o fator ambiental de maior relevância pois tem efeito imunossupressor sobre a pele, aumenta a produção local de fatores de crescimento, causa alterações genéticas na pele e induz a formação de espécies reativas de oxigênio que causam uma lesão no DNA. Os fatores de risco intrínsecos ao indivíduo são: histórico familiar de melanoma, múltiplos benignos e atípicos nevos (“pintas”), e suscetibilidade genética. Vinte e nove a 49% dos casos de melanoma não familiar ocorre na presença de um nevo displásico pré-existente. Quando se fala de histórico familiar 25 a 40 por cento dos membros de famílias propensas ao melanoma apresentam mutações no inibidor de quinases dependente de ciclina 2A (CDKN2A) e algumas famílias têm raras mutações na quinase 4 dependente de ciclina (CDK4), ambos estão envolvidos na regulação do ciclo celular (MILLER; MIHM, 2006; RASTRELLI et al., 2014). De todas as vias de

sinalização envolvidas no desenvolvimento do melanoma a via MAPK (via RAS/BRAF/MEK/ERK/MPA), envolvida no controle dos sinais de crescimento celular, sobrevivência celular e invasão, parece desempenhar um papel importante no comportamento oncogênico do melanoma. As mutações que afetam o BRAF, principalmente no domínio da quinase (V600E), foram encontradas em mais de 50% dos melanomas (CARLSON et al., 2005).

O diagnóstico do melanoma se baseia nas características morfológicas da lesão cutânea, segundo a "regra ABCDE" (assimetria, irregularidade da borda, variação da cor, diâmetro e evolução ao longo do tempo). Os critérios “ABCD” foram desenvolvidos em 1985 e são utilizados até hoje oferecendo uma precisão entorno de 60% a 80%. Atualmente a dermatoscopia, uma técnica diagnóstica não invasiva para observação *in vivo* da pele, aumentou a precisão da detecção do melanoma para até 95%(CIARLETTA; FORET; AMAR, 2011; RASTRELLI et al., 2014).

O tratamento para os melanomas primários ocorre normalmente através de excisão cirúrgica, o que produz uma alta taxa de sobrevivência. No entanto, após a metástase, a excisão cirúrgica do tumor não é tão eficiente, produzindo uma taxa de 10% de sobrevivência em cinco anos (LIU; SHEIKH, 2014). Nesta situação torna-se necessário associar outras estratégias terapêuticas para tratar a metástase, como a utilização de quimioterapia convencional e terapias alvo. No entanto, células de melanoma exibem resistência intrínseca à quimioterapia através de vários mecanismos. Com relação a terapia alvo, a utilização de inibidores de BRAF induz rápida regressão do melanoma metastático mas gera rápida resistência quando utilizado isoladamente, sendo, portanto, utilizado em associação com inibidores de MEK pois isto retarda o aparecimento da resistência. Uma outra opção terapêutica seria a utilização de imunoterapia com medicamentos como Ipilimumab, um anticorpo monoclonal que bloqueia os receptores CTLA-4 que promovem a regulação negativa da ativação dos linfócitos T. Este medicamento foi aprovado como tratamento de segunda linha para o melanoma metastático, em 2011 pelo FDA, por mostrar melhora na sobrevida dos pacientes (MISHRA et al., 2018). Apesar de existirem diferentes abordagens terapêuticas para o tratamento do melanoma metastático, este câncer é de difícil tratamento, pois, a principal barreira para o tratamento das metástases é a heterogeneidade biológica das células cancerosas na neoplasia primária e nas metastáticas (FIDLER, 2003).

1.2 ROS e Sinalização Redox

As espécies reativas de oxigênio ou ROS (do inglês “Reactive Oxygen Species”) é um termo amplamente utilizado para abranger radicais de oxigênio e derivados não radicais de oxigênio. As espécies iniciais geradas pela redução do oxigênio, bem como seus produtos reativos secundários, são geralmente consideradas ROS (WINTERBOURN, 2012). As espécies reativas de oxigênio se formam continuamente nas células eucariontes como consequência do seu metabolismo aeróbio através da redução parcial do oxigênio (O_2) nas mitocôndrias. Além das mitocôndrias outras organelas como o retículo endoplasmático e peroxissomos podem gerar ROS (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, 2014). O retículo endoplasmático produz ROS como um subproduto do dobramento proteico. O estresse do retículo pode levar a um aumento na geração de ROS em resposta ao acúmulo de proteínas mal dobradas e não dobradas. Os peroxissomos produzem ROS durante a metabolização de ácidos graxos de cadeia longa (GÀO; SCHÖTTKER, 2017). Existem ainda outros sistemas enzimáticos celulares produtores de ROS, como as xantinas oxidases, oxido nítrico sintetase (NOS), as ciclo-oxigenases, as mono-oxigenases, as lipo-oxigenases, as NADPH oxidases e o citocromo P450 (EGEA et al., 2017; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, 2014). As ROS (radical superóxido e peróxido de hidrogênio) derivados das enzimas NADPH oxidases são gerados não como subproduto, mas como uma função primária deste sistema enzimático (BEDARD; KRAUSE, 2007). As ROS geradas a partir das NADPH oxidases desempenham um importante papel em eventos de transdução de sinal e também na gênese e progressão de diversas doenças, incluindo o câncer (LANDRY; COTTER, 2014).

A sinalização celular mediada pelas ROS se denomina sinalização redox. As ROS modificam a sinalização celular através da oxidação reversível de moléculas sinalizadoras. A oxidação mediada por espécies reativas eletrolíticas e oxidativas que incluem ROS (espécies reativas de oxigênio), RNS (espécies reativas de nitrogênio) e RSS (espécies reativas de enxofre), levará a modificações proteicas nos grupos tióis (S-H) das cisteínas de proteínas redox sensíveis. Estas modificações modulam a atividade, localização e complexação de proteínas sinalizadoras. As propriedades físico-químicas tanto da molécula sinalizadora (ROS) quanto da proteína alvo e a reatividade cinética são importantes na sinalização redox (BAK; WEERAPANA, 2015;

PARVEZ et al., 2018). A reatividade das cisteínas de proteínas redox sensíveis dependem do seu microambiente e do seu valor de pKa, que quanto mais baixo, entre 3,5 à 5,1, em condições de pH fisiológico leva a desprotonação dos tióis (SH), formando ânions tiolatos (S-) altamente reativos. Estes, por sua vez, são muito susceptíveis à oxidação por ROS e RNS e podem sofrer uma variedade de modificações oxidativas que na maioria das vezes são totalmente reversíveis, *in vivo*, e utilizam oxidoredutases, como o sistema de tiorredoxina ou glutaredoxina, para restaurar rapidamente o estado redox original. (BRANDES; SCHMITT; JAKOB, 2009).

A maioria dos tióis proteicos citoplasmáticos tem valores de pKa superiores a 8,0 o que os torna grupos tióis predominantemente protonado e na sua maioria não reativo em pH intracelular. Soma-se a isto, o fato de que em condições fisiológicas normais o citosol possui um ambiente altamente redutor que mantêm a maior parte dos tióis proteicos no estado reduzido. Isto se deve aos altos níveis de glutationa e complexos sistemas de enzimas redutoras que mantêm o equilíbrio entre a glutationa reduzida (GSH) e sua forma oxidada (GSSG), dentro de níveis fisiológicos. Um ambiente global de redução celular bem regulado é essencial para a função celular e para o metabolismo (BRANDES; SCHMITT; JAKOB, 2009; OBRADOR et al., 2019).

As modificações oxidativas dos tióis levarão muitas vezes a mudanças na estrutura das proteínas modulando sua ação, por ativação ou inativação. Entretanto o tipo e a extensão das modificações oxidativas, nas proteínas redox reguladas, dependerão do tipo específico de oxidante, seu nível absoluto, bem como a localização subcelular da produção do oxidante (compartimentalização) e sua distância da proteína alvo (BRANDES; SCHMITT; JAKOB, 2009). Portanto, o conhecimento das vias de sinalizações envolvidas, das propriedades físico-químicas e da reatividade cinética das espécies envolvidas na sinalização redox são de grande importância na busca de substâncias/mecanismos que possam interferir nesta sinalização em casos de patogenia geradas por hiperativação desta via, ou ainda, o aumento da geração local e compartimentalizada destas espécies em um processo denominado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é gerado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade antioxidante celular que resulta na ativação patológica de vias celulares e também em dano a macromoléculas como lipídeos e DNA. Várias doenças estão relacionadas com a condição de estresse oxidativo, entre elas, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, metabólicas,

inflamatórias e o câncer (EGEA et al., 2017; LIU; GOMEZ GARCIA; MEYSKENS, 2012).

Existem várias atividades celulares que podem ser reguladas através das ROS, especialmente o H_2O_2 (GÀO; SCHÖTTKER, 2017). Processos celulares essenciais como proliferação, diferenciação e apoptose (STANIC; KATSUYAMA; MILLER, 2010), defesa e inflamação (BEDARD; KRAUSE, 2007), e processos conhecidos por induzir oncogêneses como sobrevivência celular, invasão, angiogênese, transformação, ativação de fatores de transcrição e de expressão gênica, remodelamento do citoesqueleto e instabilidade genômica, podem ser regulados por ROS (LANDRY; COTTER, 2014).

A exposição das células a espécies reativas ativa diversas vias de sinalização. O H_2O_2, por exemplo, está envolvido na resposta das células a seus ligantes endógenos, como FGF, EGF, TGF-β, PDGF, VEGF e insulina, potencializando a resposta celular. Sugerindo, portanto, que a ligação do ligante e a ativação das proteínas quinases ligadas ao receptor precisam de ROS para produzir a fosforilação suficiente para desencadear uma resposta biológica. Uma potencialização do efeito poderia se dá através da inativação transitória de fosfatases ou por aumento da atividade tirosina quinase do receptor. Como exemplo temos o receptor EGFR, cuja ligação ao EGF leva a oxidação, pelo H_2O_2, de um grupo tiol (para um ácido sulfênico) deste receptor e isto aumenta, portanto, sua atividade de tirosina quinase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Diferentes estímulos como fatores de crescimento, citocinas e agonistas de receptores acoplados a proteína G, podem levar a um aumento dos níveis de H_2O_2. Este aumento nos níveis das ROS ocorrem através da indução ou aumento da expressão das enzimas NADPH oxidases (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, 2014). O fator de crescimento VEGF, por exemplo, estimula a produção de ROS através da ativação de enzimas NADPH oxidases nas células endoteliais, a inibição destas enzimas utilizando o inibidor difenileno-iodônio inibiu a produção de superóxido neste tecido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; USHIO-FUKAI; ALEXANDER, 2004).

A maioria das ROS são extremamente instáveis, com meias-vidas que vão de 10^{-6} -10^{-9} s, a ROS que tem um tempo de meia vida biológica maior é o peróxido de hidrogênio que têm uma meia-vida de menos de um milésimo de segundo (LIU;

GOMEZ GARCIA; MEYSKENS, 2012). A distribuição espacial de H_2O_2 nas células e tecidos não é uniforme. Existem gradientes substanciais, tanto do espaço extracelular como intracelular quanto entre os espaços subcelulares. A concentração fisiológica intracelular de H_2O_2 em geral, em todos os organismos aeróbicos, varia de 0,001µM até um máximo de 10µM. A concentração extracelular de H_2O_2, estimado, pode ser até 100 vezes maior que a concentração intracelular. A concentração de H_2O_2 no plasma do sague está entre 1–5µM. Os processos de transdução de sinal, crescimento celular e sobrevivência mediados por H_2O_2 parecem apresentar respostas doses dependentes. Em níveis intracelulares fisiológicos baixos (0,001-0,7 µM) eles modificam a transdução do sinal celular estimulando ou inibindo a ativação de vias de sinalização. Em altas concentrações (20-200µM), oxidam várias macromoléculas celulares causando danos ao DNA, mutagênese e apoptose (figura 1) (PARASCANDOLO; LAUKKANEN, 2019).

Estudos crescentes sobre o papel das ROS vêm demonstrando que estas moléculas apresentam um caráter dual, pois o aumento excessivo de seus níveis provoca dano celular ao passo que uma produção moderada de ROS está envolvida no processo de sinalização celular e de expressão gênica (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, 2014). Portanto, em níveis citostáticos as ROS levam à manutenção de processos biológicos, já em níveis citotóxicos as ROS levam à morte celular e à desregulação imunológica. No entanto em níveis supra fisiológico as ROS promovem tumorigênese (figura 1) (SIES, 2017; WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019).

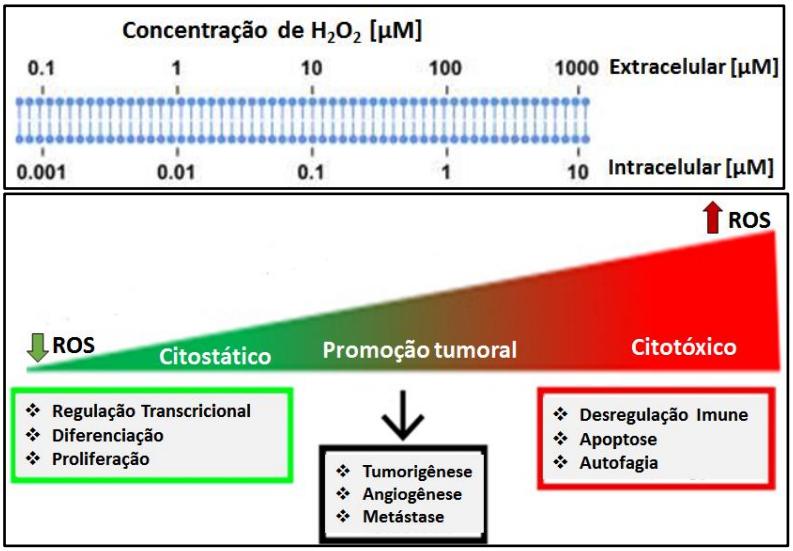


Figura 1. Concentração de ROS e seus efeitos correspondentes na função biológica. Adaptado (SIES, 2017; WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019).

1.3. NADPH Oxidases

O Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidase, conhecido como NADPH oxidase, é a principal fonte das ROS não mitocondrial. Esta é uma família de proteínas transmembranares, que consiste em uma flavoproteína, que transfere elétrons através das membranas biológicas. O aceptor final destes elétrons é o oxigênio, e o produto desta reação de transferência é o radical superóxido (WINTERBOURN, 2008). Para catalisar a redução do O_2 à $O_2^{\cdot-}$as NADPH oxidases utilizam NAD (P)H citosólico como doador de elétrons da reação. Uma vez que o complexo NADPH oxidase é ativado, um elétron do NADPH citosólico é transferido para o oxigênio no lado extracelular (MA et al., 2017; PARAVICINI; TOUYZ, 2008). O superóxido produzido pelas NADPH oxidases podem adentrar as células através do canal 3 para cloro (ClC3) ou o superóxido é dismutado, pela superóxido dismutase extracelular (SOD-EC), a peróxido de hidrogênio que adentra as células por canais de aquaporina (Figura 2) (BIENERT et al., 2007; FISHER, 2009).

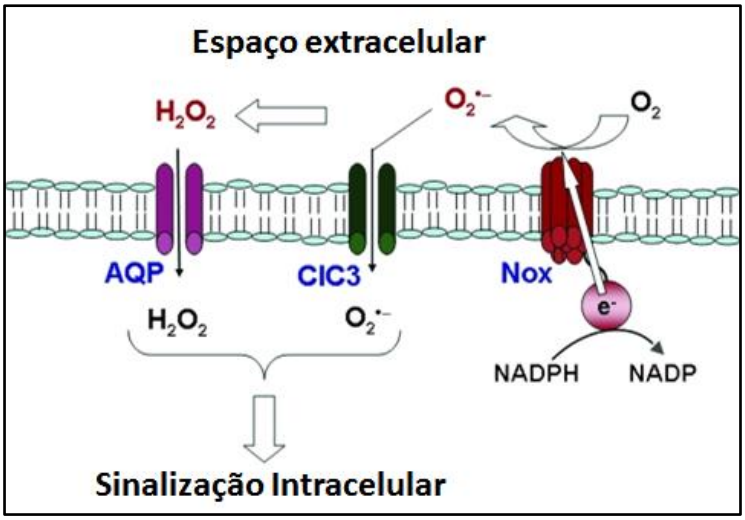


Figura 2. Geração de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase ativada (Nox). Adaptado (FISHER, 2009).

Existem sete membros da família de enzimas Nox/ Duox em humanos: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2. A função biológica da família NADPH oxidase é a produção de espécies reativas de oxigênios (ROS) como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 que estão amplamente envolvidos na sinalização e regulação celular (WINTERBOURN, 2008). A diferença entre os membros da família Nox reside em suas subunidades reguladoras e nos requisitos para ativação do complexo. Podemos classificar a família

Nox em dois grupos: Noxes dependente de p22phox, proteína transmembranar que é necessária para estabilização da subunidade catalítica, e Noxes dependente de cálcio. As Noxes dependentes de p22phox são as Nox1, Nox2, Nox3 e Nox4 e as dependentes de cálcio são Nox5, Duox1 e Duox2 (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, 2014). Diferentemente das outras isoformas, a Nox4 é constitutivamente ativa (BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014).

Todos os membros da família Nox possuem uma subunidade catalítica com seis domínios transmembranares altamente conservados cuja estrutura designa a isoforma a que a enzima pertence (Nox 1-5 ou Duox 1, 2). Os domínios transmembranares III e V contêm cada um duas histidinas que se unem a grupos hemes localizados no terceiro e quinto segmento transmembranar. Nas proteínas Duox as histidinas estão localizadas no quarto e quinto domínio transmembranar. O terminal citoplasmático COOH contém domínios conservados de dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e NADPH (Figura 3). Considerando-se que a estrutura catalítica é altamente conservada para os sete membros da família Nox a reação catalisada pela enzima será a mesma para todos os membros. As enzimas Nox são transportadoras de um único elétron. Primeiramente ocorre a transferência de dois elétrons do NADPH ao FAD, por gradiente eletroquímico, a flavina reduzida (FADH2) irá transferir um elétron por vez para a molécula de ferro do primeiro heme que seguirá para o segundo heme e, finalmente, para o oxigênio (BEDARD; KRAUSE, 2007).

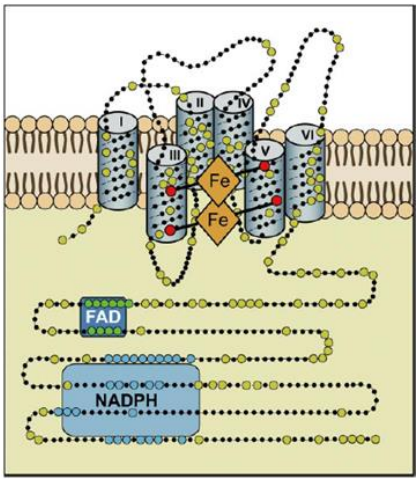


Figura 3. Estrutura do centro catalítico da família NADPH oxidase (BEDARD; KRAUSE, 2007).

As NADPH oxidases estão amplamente distribuídas pelos tecidos humanos, conforme listado na tabela 1. A Nox2 foi a primeira a ser descoberta e desempenha

um importante papel na defesa do hospedeiro (TEIXEIRA et al., 2017). Esta Nox é claramente funcional na membrana plasmática, nos fagossomos e grânulos específicos. A da Nox1 se encontra na membrana plasmática, endossomos e cavéolas. Nox4 é a isoforma associada ao retículo endoplasmático, mas sofre tráfego para muitos outros compartimentos, podendo ser encontrada também nas mitocôndrias, adesões focais e citoesqueleto, no núcleo e na membrana. A localização da Nox5 parece variável e dinâmica, semelhante a outras Noxes, mas existem algumas evidências para uma localização no retículo endoplasmático. As Duoxes maduras se localizam claramente nas membranas plasmáticas (LAURINDO; ARAUJO; ABRAHÃO, 2014).

Enzima	Local de expressão	Subunidades reguladoras	ROS produzido
NOX1	Cólon, músculo liso vascular, endotélio, placenta, próstata, útero, pele, osteoclastos, pericitos da retina.	p22 phox , NOXO1, ativador da NADPH oxidase, Rac1	Superóxido
NOX2	Fagócitos, linfócitos β, cardiomiócitos, hepatócitos, músculo liso vascular, fibroblastos, músculo esquelético, neurônios, pulmão, corpo carotídeo, rim.	p22 phox , p47 phox , p67 phox , Rac1, Rac2	Superóxido
NOX3	Tecido fetal, ouvido interno, neurônios	p22 phox , NOXO1, Rac1,	Superóxido
NOX4	Rim, músculo liso vascular, endotélio, osteoclastos, fibroblastos, queratinócitos, cardiomiócitos, osso, ovário, pâncreas, olho, músculo esquelético, testículo.	p22 phox (constitutivamente activa)	Superóxido / Peróxido de hidrogênio
NOX5	Tecido linfóide, testículo, ovário, próstata, pâncreas, baço.	Regulado por cálcio e fosforilação	Superóxido
DUOX1 / 2	Tireóide, pulmão, glândulas salivares, Trato gastrointestinal, próstata, pâncreas.	Regulado por cálcio e fosforilação	Peróxido de hidrogênio

Tabela 1. Expressão tecidual e distribuição de Nox/ Duox. Adaptado (TEIXEIRA et al., 2017).

1.3.1 Mecanismo de ativação da NADPH Oxidase

A família das NADPH oxidase, é constituída pela Nox1-Nox5 e Duox 1 e 2. O protótipo da enzima a Nox2 descoberta inicialmente em fagócitos consiste em um flavocitocromo b558, associado a membrana regulada pelos componentes citosólicos (p47phox, p67phox). Quando ativados, os componentes citosólicos se translocam para a membrana e se acoplam ao flavocitocromo resultando em uma conformação favorável para a transferência de elétrons (LEWIS et al., 2010). Este flavocitocromo é formado pela subunidade catalítica (Nox) do complexo NADPH oxidase e está constitutivamente associado a proteína p22phox que é necessária para estabilização da subunidade catalítica e ligação das subunidades reguladoras citosólicas (Figura 4). As subunidades reguladoras variam de acordo com o complexo de NADPH oxidase (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, 2014). A subunidade ativadora tanto para Nox1 quanto para

Nox2 é a p67phox ou proteínas homólogas (ref) que contém um domínio ativador e são necessárias para a transferência de elétrons pela subunidade catalítica para o oxigênio molecular gerando o superóxido que é o produto da enzima. A subunidade organizadora de Nox1 é o p47phox e seus homólogos que quando fosforilado promove o acoplamento das outras subunidades na subunidade catalítica através da sua ligação ao p22phox (GIMENEZ et al., 2016; LAMBETH; NEISH, 2014; MA et al., 2017). Outro regulador conhecido da atividade de Nox1 é a Rac1 uma GTPase necessária para a ativação da enzima (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, 2014).

A regulação da atividade do sistema Nox1 é dependente da fosforilação da subunidade p47phox. Para que a produção do superóxido pela Nox1 ocorra é necessário a ativação da subunidade p47phox que decorre da fosforilação em diversas serinas localizadas na região carboxi terminal da proteína. As subunidades reguladoras citosólicas p47phox e p67phox, juntamente com a GTPase Rac1, são necessárias para a ativação do complexo. Alternativamente, Nox1 pode ser ativado por duas proteínas diferentes, NoxO1 (Nox organizador 1) e NoxA1 (Nox ativador 1), homólogos de p47phox e p67phox, respectivamente (GIMENEZ et al., 2016)

As isoformas Nox5, Duox1 e 2 contêm um terminal N longo com quatro sítios de ligação ao Ca^{2+}, conhecido como domínio de ligação ao cálcio (sítios de ligação ao cálcio *EF-hand*). A Nox5 gera superóxido e as Duox 1-2 geram peróxido de hidrogênio, como produto, em resposta à elevação intracelular do Ca^{2+}(TIRONE et al., 2010). Nox4 é constitutivamente ativa e não necessita de subunidades citosólicas (LAMBETH; NEISH, 2014).

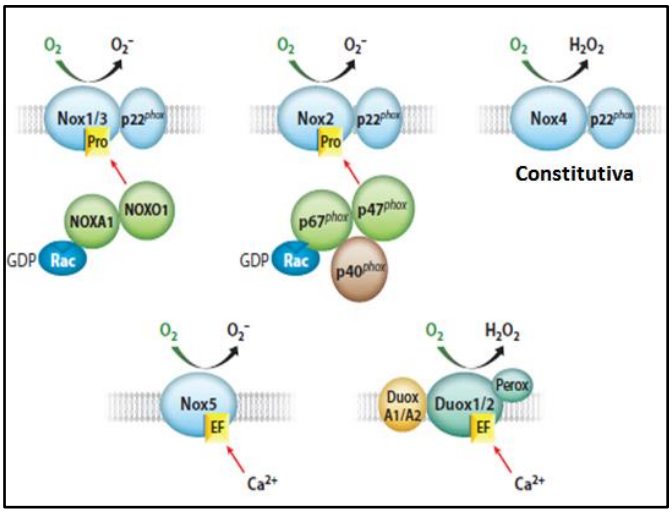


Figura 4. Representação esquemática da Família da NADPH oxidase. Adaptado (LAMBETH; NEISH, 2014).

O gene humano e de camundongo de Nox1 está localizado no cromossomo X. A massa molecular de Nox1 varia entre 55-60 kDa. Nox1 se encontra altamente expressa no epitélio do cólon e se encontra em menor quantidade em outros tecidos como células endoteliais, osteoclasto, placenta, útero, próstata e células do músculo liso vascular (BEDARD; KRAUSE, 2007).

Nox1 não produz superóxido em seu estado basal. É necessária a ação de algum agonista para a sua ativação (NAUSEEF, 2008). Nox1 pode ser induzida por diversos ligantes de receptor tirosina quinase (RTK) (Figura 5), tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), angiotensina II (Ang II), citocinas como, por exemplo, proteína morfogênica óssea 4 (BMP4) e interferon gama (INF-γ) e interleucinas como (IL)-1β, assim como sua expressão gênica também pode ser induzida pelos mesmos fatores através da ativação de vias de sinalização MAPK, como ERK 1/2 e p-38 (PARASCANDOLO; LAUKKANEN, 2019). A atividade de Nox1 é regulada por múltiplos mecanismos: regulação transcripcional em resposta a estímulos, estabilização de proteínas, moléculas reguladoras interagindo com Nox1 e modificações pós-traducionais do complexo NADPH oxidase. Vários fatores de transcrição podem regular a expressão de Nox1, entre eles estão a proteína ativadora-1 (AP-1), fator nuclear kappa-B (NF-kB), fator de transcrição ativado 1 (ATF-1), transdutor de sinal e ativador de transcrição 1/3 (STAT 1/3) (GIMENEZ et al., 2016).

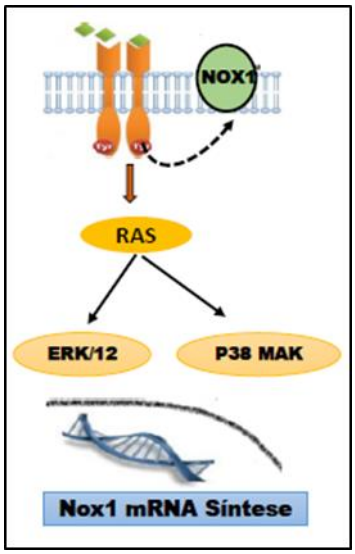


Figura 5. Estimulação da expressão de Nox1. A ativação da Nox1 por fatores de crescimento induz a via RAS-ERK1/2 e vias de sinalização RAS-p38MAPK, que estimulará a síntese de mRNA de Nox1 Adaptado de (PARASCANDOLO; LAUKKANEN, 2019).

1.4 Status redox do Microambiente Tumoral

O microambiente tumoral é um sistema de suporte chave para o crescimento tumoral. O microambiente tumoral é complexo e inclui dois componentes principais inter-relacionados: o microambiente tumoral físico (matriz extracelular, vasos sanguíneos, células endoteliais, estromais e inflamatórias, e outras estruturas de suporte do órgão em particular); e o microambiente tumoral fisiológico (oxigênio, pH, nutrientes, resíduos, moléculas sinalizadoras, espécies redutoras/oxidantes, fatores de crescimento, fatores pró-tumorigênicos, entre outros). Um importante parâmetro fisiológico do microambiente tumoral é a hipóxia tecidual, uma consequência da angiogênese desequilibrada, que está associada a alterações nas vias metabólicas, incluindo uma maior dependência da glicólise, resultando em acidose tecidual. Tanto a hipóxia como a acidose afetam o estado redox do tecido e o seu principal componente intracelular, a glutationa (GSH) (KHRAMTSOV; GILLIES, 2014).

O microambiente redox tumoral é caracterizado por baixo potencial redox e alta capacidade redutora, devido a superexpressão de GSH encontrados em vários tipos de tumor, levando a níveis mais elevados de GSH nos tumores, sendo até várias vezes maior do que nos tecidos adjacentes. Entretanto elevados níveis de geração de ROS intracelular e extracelular e produtos de peroxidação lipídica foram detectados em quase todos os cânceres. Um microambiente tumoral extracelular altamente redutor favorece o fluxo de elétrons dos redutores para o oxigênio dissolvido, resultando na produção de superóxido (KHRAMTSOV; GILLIES, 2014).

A alta capacidade redutora, hipóxia e acidose do microambiente tumoral expõe as células cancerígenas e não transformadas à produção elevada de ROS. O estresse oxidativo correspondente é rigidamente controlado nas células cancerígenas pela defesa antioxidante superexpressa em um nível suficiente para garantir uma via de sinalização para a proliferação, evitando ao mesmo tempo um dano oxidativo fatal. No entanto, o mesmo nível elevado de geração de ROS extracelular pode ser altamente tóxico e mutagênico para células normais, devido às atividades significativamente menores de enzimas antioxidantes e ao conteúdo de GSH (KHRAMTSOV; GILLIES, 2014).

Nos tumores, tanto células tumorais como células do microambiente tumoral, produzem quantidades substanciais de ROS e fatores de crescimento que podem

estimular o crescimento e a vascularização do tumor (KIM; BYZOVA, 2014; WHEELER; SMUTNEY; JUDE SAMULSKI, 2003). Células endoteliais, fibroblastos e macrófagos associados ao tumor, interagem com as células tumorais determinando a progressão e crescimento tumoral. Os macrófagos estão frequentemente presentes já no estágio inicial do desenvolvimento do tumor, isto sugere que os próprios macrófagos são a força motriz que contribui para o início do tumor e/ou progressão inicial do tumor (LORUSSO; RÜEGG, 2008). Na maioria dos cânceres, os macrófagos que residem no microambiente tumoral exibem o fenótipo M2 que além de mediar o crescimento e progressão tumoral, interagem com outras células do sistema imunológico e suprimem a resposta imune antitumoral inata e adaptativa. Alguns estudos demonstraram que as ROS desempenham um papel chave na diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2. Estudos feitos em células de monócitos demonstraram que a supressão da expressão da GTPase Rac1, um componente essencial dos complexos enzimáticos Nox1 e Nox2 desta célula, bloqueia eficientemente a diferenciação de macrófagos M2. O mesmo ocorre com a utilização do inibidor de NADPH oxidase hidroxianisol butilado (BHA). Sugerindo, portanto, que o superóxido derivado das NADPH Oxidases tem um importante papel na diferenciação de macrófagos para o fenótipo M2 (ZHANG et al., 2013).

A proliferação, ativação e diferenciação de diferentes células do microambiente tumoral podem ser moduladas por ROS. As ROS podem afetar a proliferação e migração de fibroblastos associados ao câncer (CAFs), assim como afetar os subtipos de fibroblastos. As ROS promovem a conversão de fibroblastos em miofibroblastos. Nox4 produz as ROS necessárias para a conversão de fibroblastos em miofibroblastos, direcionada por TGF-β. ROS gerados por CAFs resulta na secreção de fatores pró-invasivos que promovem a motilidade celular e neoangiogênese (COSTA; SCHOLER-DAHIREL; MECHTA-GRIGORIOU, 2014; JAIN et al., 2013). As ROS também influenciam a função das células T. No sítio inflamatório, as células T estão presentes em um nicho oxidativo devido à liberação de ROS por neutrófilos. A exposição persistente a altos níveis de ROS pode inibir a proliferação de células T e levar à apoptose (THORÉN et al., 2007). As ROS desempenham um papel duplo na regulação das respostas imunes mediadas por células T. A geração de baixos níveis destas moléculas por curto período de tempo é necessária para a sinalização induzida pela estimulação do receptor de células T, caracterizada pela proliferação de células

T, secreção de citocinas e eliminação de patógenos por fagocitose. Por outro lado, altos níveis e exposição prolongada as ROS resultam em alteração na via de sinalização do TCR (Receptor de linfócito T) que leva à geração de resposta inflamatória e agravamento dos distúrbios associados (GAMBHIR et al., 2019). Nos tumores o peróxido de hidrogênio está envolvido nos mecanismos de ativação linfocitária e na indução de angiogênese por estas células durante o crescimento do tumoral (MONTE; DAVEL; SACERDOTE DE LUSTIG, 1997).

As ROS derivadas de Nox1 e Nox2 estão envolvidas na diferenciação de monócitos para macrófagos, na polarização de macrófagos do tipo M2 e na ocorrência de macrófagos associados a tumores (TAMs). O nocaute duplo de Nox1/2 em monócitos derivados da medula óssea de camundongos afetou a diferenciação destas células para macrófagos (F4/80+) quando comparados com camundongos WT. A população de macrófagos M2 também foi reduzida nos camundongos nocautes de ambas as enzimas. Utilizando-se um modelo tumoral no qual células LLC (leucemia linfoide crônica) de camundongos foram inoculadas subcutaneamente em camundongos nocautes de Nox1/2 e camundongos selvagens (WT), observou-se que a perda de Nox1/2 não afetou significativamente a infiltração global de macrófagos, mas diminuiu potencialmente a ocorrência de TAMs do tipo M2 durante o desenvolvimento do tumor, ao mesmo tempo também inibiu o crescimento do tumor bem como a formação de foco metastático no pulmão (XU et al., 2016).

No microambiente as ROS promovem um cross-talk, ou seja, podem modular as interações entre as células tumorais e as células do microambiente. Desta forma favorece o crescimento e a progressão tumoral de forma direta, modulando a secreção de fatores pró-tumorais por células do microambiente, ou de forma indireta pela regulação da atividade destas células (COSTA; SCHOLER-DAHIREL; MECHTA-GRIGORIOU, 2014).

Nas últimas décadas foram desenvolvidos medicamentos direcionados para modificar componentes de suporte do microambiente tumoral. Muitos desses já estão em uso clínico, como os inibidores de angiogênese, bevacizumabe, e medicamentos que ativam células imunes, Ipilimumab e Pembrolizumab, contra o tumor. Entretanto mecanismos compensatórios do hospedeiro podem diminuir ou anular o efeito desses medicamentos. Neste cenário uma modulação redox no microambiente tumoral do hospedeiro pode contribuir para aumentar a resistência as terapias antitumorais

(SHAKED, 2019; TRACHOOTHAM; ALEXANDRE; HUANG, 2009). Diante disto é fundamental compreender como uma terapia direcionada contra ROS do microambiente poderia contribuir para potencializar a terapia antitumoral ou superar a resistência aos tratamentos. Nosso grupo se propôs a compreender como a supressão de ROS do microambiente, via inibição de Nox1 do hospedeiro, pode contribuir na terapêutica do melanoma.

1.5 NADPH oxidase e Melanoma

O elevado nível das ROS no câncer é algo já bem estabelecido para a maioria dos cânceres (EGEA et al., 2017). As células de melanoma, assim como, outros tumores, apresentam níveis mais elevados e patológicos das ROS (ROUAUD et al., 2016). A expressão de Nox1, Nox2 e Nox4 em células cancerígenas promove o crescimento de tumores e metástases em vários tipos de câncer, incluindo tumores de melanoma, estômago, pâncreas e cólon (JUHASZ et al., 2017). As NADPH oxidases Nox1, Nox4 e Nox5 estão implicadas também na invasão, metástase e angiogênese tumoral (figura 6) (PARASCANDOLO; LAUKKANEN, 2019; TEIXEIRA et al., 2017). A Nox1 está envolvida com a migração (PRASAD; KAPPES; KATIYAR, 2016), invasão via indução de EMT (LIU; GOMEZ GARCIA; MEYSKENS, 2012) e proliferação de células tumorais (ARNOLD et al., 2001; BAUER, 2014; SANCHO; FABREGAT, 2010).

Vários estudos mostraram que a expressão de Nox1 em células de melanoma promove o crescimento deste tumor. No entanto, o papel de Nox1 do hospedeiro no crescimento do melanoma ainda precisa ser melhor caracterizado. Diante disto, nosso trabalho teve por objetivo compreender o papel da Nox1 do hospedeiro no microambiente redox tumoral do melanoma. O uso de animais deficientes de Nox1 nos permitirá compreender melhor a contribuição desta enzima para o microambiente tumoral, visto que a inibição farmacológica de Nox1 pode ser inespecífica e envolver outras isoformas, o que causaria erros na interpretação dos resultados obtidos. Muitos estudos de regulação redox foram realizados em células em cultura, entretanto, é preciso ter cuidado na interpretação dos resultados. É possível que células cultivadas se adaptem a altas concentrações de oxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

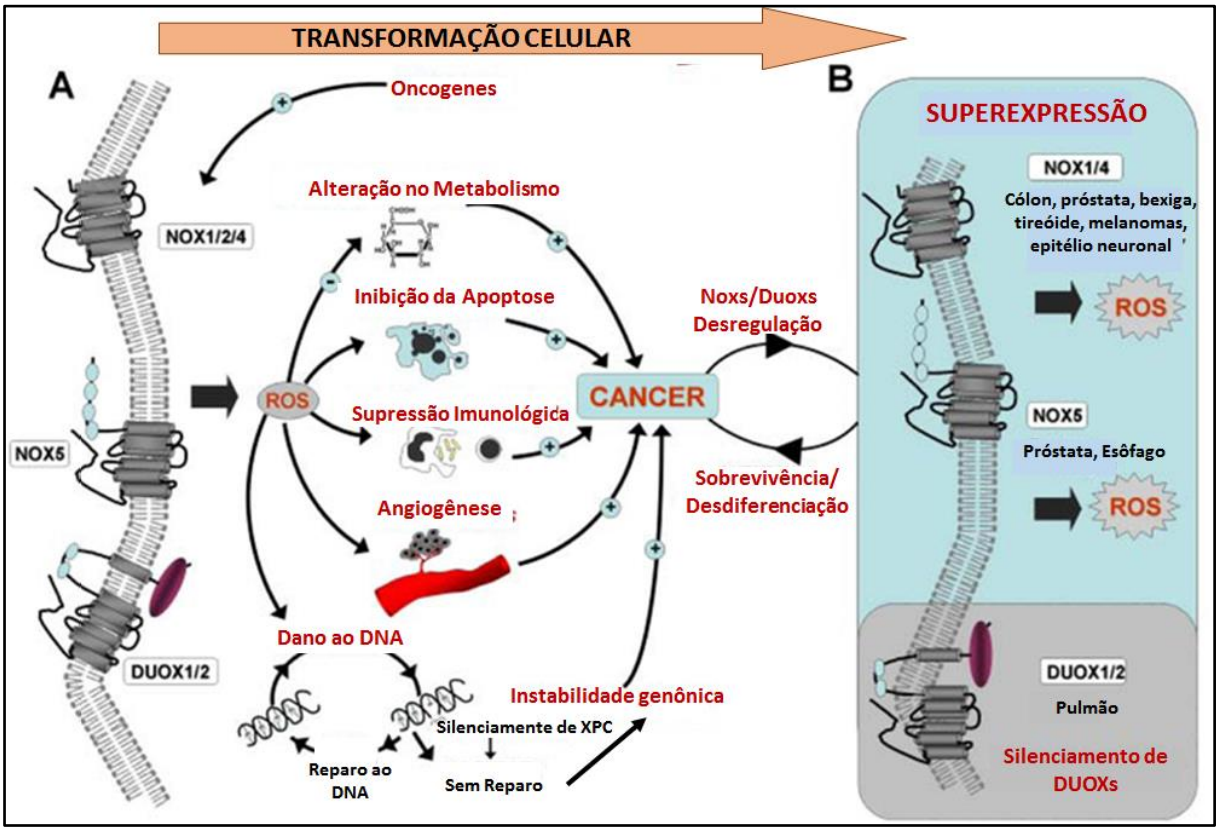


Figura 6. Modelo para o papel das NADPH oxidases no desenvolvimento do câncer. **A**, Oncogenes ativam constitutivamente as NADPH oxidases que resulta em produção acumulada das ROS e na formação de danos no DNA e aberrações cromossômicas, levando à instabilidade genômica e transformação celular. ROS produzidos por NADPH Oxidases, principalmente Nox1/2/4 desempenham papéis críticos na angiogênese durante a carcinogênese. NOXs, também pode desempenhar um papel crítico na supressão imunológica do câncer, especialmente nas células supressoras derivadas de células mieloides (MDSC). Nox1 e Nox2 favorecem a sobrevivência em numerosos tipos de células através da inibição da apoptose. **B**, a transformação celular resulta em superexpressão de NOXs em muitos cânceres. A Nox1 e Nox4 são encontradas em diversos tipos de tumores incluindo melanoma, câncer de próstata, tireoide, mama, bexiga, rim e cólon. A superexpressão de Nox5 foi observada no câncer de esôfago. A superexpressão de Nox leva à produção acumulada de ROS, o que, por sua vez, pode aumentar a sobrevivência e a proliferação de células cancerígenas. Em contraste, o silenciamento de DUOX pode promover a desdiferenciação celular e promover a progressão do câncer. Adaptado (WEYEMI et al., 2013).

2 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da NADPH oxidase Nox1 do hospedeiro na regulação redox do microambiente tumoral do melanoma.

2.1 Objetivos Específicos

1. Avaliação de crescimento tumoral por um período de 15 dias após inoculação das células B16F10 luciferase por via subcutânea em camundongos fêmeas com fundo genético C57Bl/6 Wild-type (grupo controle) e deficientes de Nox1 (Nox1-/-).

2. Analisar o perfil de expressão gênica de Nox1 e Nox4 na linhagem celular murina B16F10.

3. Analisar comparativamente a expressão gênica de Nox1 e Nox4 nos tumores dos camundongos Wild-type (grupo controle) e deficientes de Nox1 (Nox1-/-).

3. Análise nos tumores das vias de sinalização redox reguladas por Nox1: via de ativação do EGFR: fosforilação do EGFR e ativação de MAPK (ERK 1/2, p-38 e JNK), AKT e STAT3.

4. Análise da angiogênese nos tumores obtidos de camundongos Wild-type (grupo controle) e deficientes de Nox1 (Nox1-/-).

5. Análise da expressão de marcadores de angiogênese, VEGFA, e de ciclo celular, ciclina D, ciclina E, p21, p27 e de apoptose, BCL2 e BAX.

6. Analisar comparativamente as populações de células do infiltrado tumoral nos camundongos Wild-type e deficientes de Nox1.

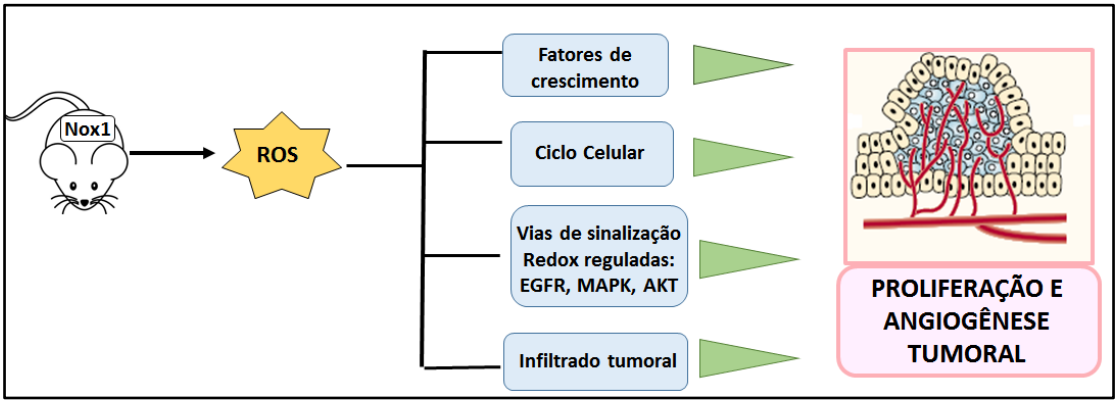


Figura 7. Hipótese do papel da Nox1 do hospedeiro (microambiente) no crescimento do melanoma.

3 METODOLOGIA

Muitos modelos, *in vitro* e *in vivo*, já foram desenvolvidos para auxiliar o estudo da tumorigênese. E embora os modelos de cultura celular e *in vitro* sejam valiosos e essenciais para a compreensão dos processos biológicos, fisiopatológicos moleculares e os efeitos das alterações genéticas, é impossível reproduzir completamente a complexidade de todo um organismo e o microambiente em que os tumores se desenvolvem nestes modelos (KUZU et al., 2015). Um modelo experimental ideal para estudos de tumorigênese é aquele que reproduz de maneira mais próxima o que acontece no homem com relação à etiologia da doença, a base genética molecular e a arquitetura histopatológica (HA et al., 2005). Portanto, se faz necessário o desenvolvimento de um modelo in vivo efetivo e eficiente que compartilhem semelhanças substanciais com os melanomas humanos (KUZU et al., 2015).

Existem alguns modelos conhecidos para o estudo de melanoma in vivo como os modelos de xenoenxertos, modelos de transplantes singênicos e modelos transgênicos. Para este estudo foi escolhido o modelo de transplantes singênicos, onde tanto o doador quanto o receptor são da mesma linhagem. Este modelo têm benefícios importantes sobre os de xenoenxerto, pois permite a interação de células de melanoma com células da resposta imunológica encontradas no microambiente deste tumor. Os modelos singênicos podem empregar várias linhagens de melanoma, no entanto o tipo de célula mais utilizado é a linhagem celular B16 que forma espontaneamente tumor em camundongos C57BL/6J (KUZU et al., 2015). Por isto, nós escolhemos as células de melanoma murino B16F10 que foram inoculadas em camundongos C57BL/6J WT e camundongos C57BL/6J transgênicos com deficiência do gene de Nox1. Esta linhagem foi obtida pela deleção do fragmento de 1.9 kb, que codifica os exons 3 a 6, do gene da NADPH oxidase 1 (Nox1) ligado ao cromossomo X (Figura 6), o que produziu fêmeas homozigotas e machos hemizigotos que são viáveis. Por RT-PCR confirmou-se a ausência do mRNA de Nox1 na aorta destes animais (GAVAZZI et al., 2006).

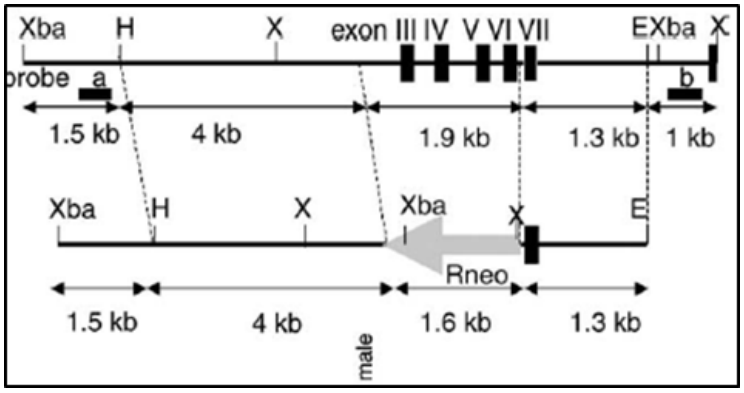


Figura 8. Geração de camundongos deficientes em Nox1 (GAVAZZI et al., 2006).

3.1 Amostra

O estudo foi realizado de acordo com o protocolo de ética n° 120/2017 CEUA-ICB/USP. Foram utilizados animais da espécie Mus musculus, linhagem C57BL/6 selvagens e linhagem C57BL/6, deficiente de Nox1, fêmea. Para cada experimento foi utilizado um número amostral diferente, que seguiu a disponibilidade de animais deficientes de Nox1. A linhagem celular utilizada neste estudo foi a de melanoma murino B16F10 que expressa luciferase (B16F10luc). Os animais utilizados foram camundongos fêmeas, com idade entre 10-12 semanas, com fundo genético C57Bl/6 Wild-type (WT), grupo controle, e deficientes de Nox1 (Nox1-/-), grupo experimental. Os animais deficientes foram gerados pelo Dr. K.H. Krause (GAVAZZI et al., 2006). Os animais WT foram obtidos do Biotério central da USP (FMUSP). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno padrão com no máximo cinco animais por caixa, mantidos a temperatura de 22°C com livre acesso a água e alimentos e com ciclo de foto período de 12/12hs. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

3.2 Cultura de células B16F10

As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco™) em garrafas de cultura de poliestireno e posteriormente incubado à 37º C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO_2. Quando as culturas de células atingiram a subconfluência o meio foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com PBS sem cálcio e magnésio e em seguida

dissociadas utilizando 1mL de tripsina- EDTA (37°C). Na sequência foi adicionado um meio de cultura novo e as células foram aspiradas, replaqueadas e mantidas nas condições descritas acima. As células foram periodicamente observadas em microscópio óptico de luz invertida. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias. A criopreservação, quando necessário, foi feita com 90% de meio RPMI suplementado com SFB mais 10% de DMSO. Após o descongelamento o DMSO foi removido imediatamente transferindo-se o conteúdo do frasco para um tubo de centrífuga contendo 9,0 ml de meio de cultura completo e centrifugado a aproximadamente 1500rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante era descartado e o pellet de células ressuspenso em meio de cultura.

3.3 Avaliação do crescimento tumoral

No modelo singênico de melanoma B16F10 murino a inoculação subcutânea, no dorso do animal gera um tumor palpável dentro de 5 a 10 dias que cresce numa taxa de $1cm^3$ até o 14°/21° dia. Quando o tumor deixa de crescer, frequentemente torna-se necrótico no centro e ocorre ulceração e/ou sangramento, sendo aconselhável sacrificar os camundongos antes que ocorra esta fase. A dose recomendada para inoculação fica na faixa de 1×10^4 a 5×10^6. Uma dose média de inoculação é $2x10^5$ células/camundongo. Para os experimentos de crescimento de tumores subcutâneos é importante que haja uma técnica de injeção consistente, em que cada camundongo apresente uma protuberância claramente visível, definida como “bolha” no local da inoculação, pois a inoculação inadequada pode causar crescimento tumoral atrasado ou o não desenvolvimento do mesmo (OVERWIJK; RESTIFO, 2001; ZHIYA et al., 2015).

Nós inoculamos 2.10^5 células B16F10luc via subcutânea no dorso do camundongo, com idade entre 10-12 semanas, devido ao fato de que a formação de um tumor sólido neste local acarreta menores transtornos ao animal durante a sua movimentação e impede que o animal se automutile na região do tumor. A avaliação do crescimento tumoral foi realizada a partir do quinto dia após a inoculação até o décimo quinto dia (OVERWIJK; RESTIFO, 2001). Para minimizar o sofrimento do animal o mesmo foi eutanasiado, por deslocamento cervical, quando completou o 15°

dia após a inoculação, pois de acordo com a literatura o tumor cresce até o 14°-21° dia quando então torna-se necrótico. Outra medida para minimizar o sofrimento do animal foi o monitoramento do crescimento tumoral para que caso o tumor atingisse $2cm^3$, antes do 15° dia, o animal fosse eutanasiado.

As dimensões foram medidas de maneira externa ao tumor utilizando-se um paquímetro e foi mensurada a cada 48hs-72hs. O volume do tumor foi avaliado a partir da fórmula $V= (D1)^2 \times D2 \times 0,52$, sendo que as medidas D1 e D2 se referem ao maior e o menor diâmetros perpendiculares, respectivamente, medidos com um paquímetro (ROLAND et al., 2009). A unidade estabelecida foi cm^3. Quando o tumor atingiu o volume de $2cm^3$ os animais foram sacrificados para evitar maiores transtorno ao animal. Após a remoção cirúrgica foi feita a pesagem da massa tumoral em gramas utilizando uma balança digital.

Os animais foram monitorados diariamente para a verificação das condições de bem estar do animal, que foi analisada através de parâmetros como a capacidade de locomoção, alimentação e sinais de dor (piloereção, arqueamento, vocalização).

3.4 Avaliação da expressão gênica nos animais deficientes de Nox1 por qPCR.

Extração do RNA

A extração do RNA total das amostras foi feita com Trizol (life tecnologia), segundo o protocolo do fabricante. As células foram lisadas em 1mL de Trizol e, após incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, adicionou-se 200µL de clorofórmio e os tubos foram vertidos vigorosamente por 15 segundos. Seguiu-se de uma nova incubação em temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 g, 4°C por 15minutos. Em seguida, a fase aquosa contendo o RNA total foi retirada cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta, evitando contaminação com as outras duas fases contendo DNA e proteína. A fase aquosa foi adicionado 0,5 mL de isopropanol 100% (para cada 1mL de Trizol) seguido de incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 g, 4°C por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75% homogeneizados brevemente em vórtex e centrifugados a 7500 g, 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e deixou-se o precipitado secar (~ 10 min.).

O RNA foi então ressuspendido em água livre de RNase e colocado em banho seco 60°C por 15 minutos. O RNA obtido foi quantificado através da leitura a 260nm em espectrofotômetro NanoDrop, sendo as relações 260/280 e 260/230 consideradas para evitar contaminação das amostras por impurezas orgânicas e inorgânicas, e proteínas.

RT-PCR

O RNA obtido foi convertido em cDNA através da reação de transcrição reversa utilizando o Kit Thermo Script – RT PCR (Invitrogen – Life technologies), seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA obtido foi quantificado através da leitura a 260nm em espectrofotômetro NanoDrop e as amostras foram guardadas a – 20°C.

PCR em tempo Real quantitativa (qPCR)

Para análise de expressão gênica em tempo real foi utilizada a metodologia do SYBR® Green. Foi utilizado 100ng-120ng de cDNA em um volume final de 12µL por reação. Os parâmetros de ciclagem termal foram feitos de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems 7300 Real Time PCR). Foram avaliados a expressão dos genes de Nox1, Nox4, Ciclina D1, VEGFA, Bcl2 e Bax, todos murinos. Para normalização da expressão foi utilizado o gene constitutivo GAPDH (murino), cujas sequências dos primers estão descritos na tabela 2. A análise de cada gene foi realizada em triplicata para Nox1 e Nox4 e em duplicata para os demais genes. Para a quantificação relativa da expressão dos genes alvos em relação ao gene referência GAPDH, foi utilizando o método Cq (ciclo de quantificação, ou Ct) comparativo (conhecido também como método ΔΔCt ou método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) proposto por (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Esse método é baseado na razão da expressão relativa (fold-change).

NADPH oxidase 1 (Nox1) – murino	
Fw 5′	GTAGGTGTGCATATGGGTGTCA
Rv 5′	CCGCAAAATGAGGATGCCTG
NADPH oxidase 4 (Nox4) – murino	
Fw 5′	CCAAATGTTGGGCGATTGTGT
Rv 5′	GCCATCGTTTCTGACAGAGC

Ccdn1(mu)	
Fw 5′	TGCTGCAAATGGAACTGCTT
Rv 5′	CCACAAAGGTCTGTGCATGCT
VEGFA (mu)	
Fw 5′	TGTACCTCCACCATGCCAAGT
Rv 5′	TGGTAGACATCCATGAACTTG
Bcl2 (mu)	
Fw 5′	CTGGCATCTTCTCCTTCCAG
Rv 5′	GACGGTAGCGACGAGAGAAG
Bax(mu)	
Fw 5′	TAGCAAACTGGTGCTCAAGG
Rv 5′	TCTTGGATCCAGACAAGCAG
GAPDH - murino	
Fw 5′	TTGTGGAAGGGCTCATGACC
Rv 5′	TCTTCTGGGTGGCAGTGATG

Tabela 2. Sequência dos primers para PCR.

3.5 Análise das vias de sinalização redox dependentes por Western Blotting

Para analisar as vias de sinalização redox reguladas por Nox1 foi utilizado o western blotting. Os tumores foram macerados em nitrogênio líquido e as células foram lisadas em tampão de lise para tecido (contendo 10 mM de EDTA, 100 mM de Tris-base, 10 mM de pirofosfato de sódio, 10 mM de fluoreto de sódio e 10 mM de ortovanadato de sódio, 200 mM de PMSF, Triton e 0,01mg/ml aprotinina). O homogeinato coletado foi sonicado e centrifugado, o sobrenadante foi separado para dosagem de proteína pelo método de Bradford.

Uma alíquota de proteína 30µg-50µg foi submetida ao método de separação por eletroforese em gel de poliacrilamida (6% a 10%), contendo laurel sulfato de sódio (SDS-PAGE), e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A corrida no gel foi realizada utilizando tampão de corrida 1x (composto por 3,03g de Tris-base, 1,44g de glicina, 0,5g de SDS dissolvidos em água destilada p.s.p. 1L) e a transferência utilizando-se tampão de transferência 1x (composto por 6,55g de Tris-

base, 7,12g de glicina, 1,0g de SDS dissolvidos em água destilada p.s.p. 1L). Para as proteínas de baixo peso molecular a transferência foi realizada em sistema Trans-blot SD semy-Dry (BioRad) a 10V constante por 1h. Para proteínas de alto peso molecular foi feita transferência pelo mesmo sistema por um tempo maior (2hs). A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração da membrana de nitrocelulose em Ponceau por 2-3 minutos. Em seguida as membranas foram submetidas a solução de bloqueio, composta por BSA 3% dissolvido em solução basal de lavagem, por 1h a temperatura ambiente para minimizar as ligações inespecíficas. Para detectar as proteínas de interesse, as membranas foram incubadas, sob agitação com o anticorpo primário, diluído em BSA3%, específicos para as proteínas de interesse, por 16 h, à 4ºC. A seguir, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com solução basal de lavagem 0,05% (pH 7,6) (composta por 8,76g de NaCl, 100mL Tris 1M pH 8, 50ul de Tween-20 e água destilada q.s.p 1L). Na sequência foram incubadas com o anticorpo secundário fluorescente, diluído em BSA3%, por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação. A seguir, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com solução basal de lavagem. Após as lavagens as membranas foram escaneadas no leitor de infravermelho Odyssey (LI-COR Biosciences, Bad Hamburg, Alemanha).

A intensidade das bandas foi determinada por análise densitométrica através do programa Image J, e utilizada como medida de atividade proteica. Para as análises de atividade proteica os resultados foram normalizados pela forma total da proteína, pois o objetivo era verificar se havia alteração na atividade e não na expressão (normalização pela beta actina). Os anticorpos utilizados e proteínas analisadas se encontram na tabela abaixo.

ANTICORPOS UTILIZADOS				
ANTICORPO	**DILUIÇÃO**	**MARCA**	**CÓDIGO**	**FONTE**
EGFR Total	1:500	cellsignaling	#2232	rabbit
phospho - EGFR (Tyr 1173)	1:500	Millipore	05-483	mouse
P-38	1:1000	cellsignaling	#9212	rabbit
phospho P-38 (Thr180/Tyr182)	1:1000	cellsignaling	#9216	mouse
ERK 1/2	1:1000	cellsignaling	#9102	rabbit
phospho- ERK 1/2(Thr202/Tyr204)	1:1000	cellsignaling	#9106	mouse
AKT	1:1000	cellsignaling	#9272	rabbit
phospho- AKT (Ser 473)	1:1000	cellsignaling	#9271	mouse
JNK	1:1000	cellsignaling	#9252	rabbit

phospho- JNK (Thr 183/Tyr185)	1:1000	cellsignaling	#4668	rabbit
STAT3	1:1000	cellsignaling	#9132	rabbit
Phospho- STAT3	1:1000	cellsignaling	#9131	rabbit
p21	1:2000	cellsignaling	#2947	mouse
p27	1:2000	cellsignaling	#3686	rabbit
β-Actin	1:1000	cellsignaling	#4970	rabbit
β-Actin	1:5000	Merck	A5441	mouse
Ciclina E	1:200	Santa Cruz	sc-247	mouse

Tabela 3. Anticorpos utilizados e proteínas analisadas por blotting.

3.6 Análise de angiogênese em animais deficientes de Nox1

Após 15 dias da inoculação os animais foram eutanasiados e perfundidos com solução salina. Os tumores foram então retirados, isolados, fixados com paraformaldeído (4hs) e conservados em solução de glicose 30% até a secção. O tecido congelado foi seccionado no criostato em série (10µm de espessura) e foram imunocorados. As lâminas foram incubadas overnigth a temperatura ambiente com anticorpos monoclonais primário contra CD31 de rato (BD Pharmigen), diluição 1:200 em 0,3% de Triton X-100 mais 5% de soro normal do animal em que foi feito o anticorpo secundário (cabra). O controlo negativo teve o anticorpo primário substituído por Triton (AMJADI et al., 2016). As lâminas foram subsequentemente lavadas em tampão fosfato 0,1M 3 vezes de 10 minutos e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário conjugado com biotina 1:200 em 0,3% de Triton X-100. Após incubação lavou-se as lâminas 3 vezes de 10 minutos em PB 0,1M. O próximo passo foi a incubação com o kit ABC (Vector Laboratories). Diluiu-se as soluções A e B do Kit ABC 1:100 em 0,3% de Triton X-100 contendo NaCl (0,4M) e incubou-se por 2 horas. Após incubação lavou-se as lâminas 3 vezes de 10 minutos em PB 0,1M. Seguiu-se para a revelação com diaminobenzidina (DAB). Uma alíquota de DAB foi diluída em 100ml de PB 0,1M onde os cortes foram pré incubados por 3 minutos. A esta solução adicionou-se aos pouco peróxido de hidrogênio (1mL de H_2O_2 0,3%) até oxidação da reação e visualização da marcação. Após a revelação os cortes histológicos foram desidratados em álcool (cadeia crescente) e xilol.

A determinação da densidade microvascular foi realizada conforme método descrito por (WEIDNER et al., 1991). As três áreas mais altamente vascularizadas do

tumor, denominadas “hot spots”, foram detectadas em menor aumento (40x) e selecionadas em cada uma das lâminas coradas. Foi contado os microvasos nessas três áreas selecionadas. A contagem final de microvasos foi expressa como o número médio de vasos nestes três campos. Na contagem foi considerada as células coradas em marrom tanto isoladas quanto agrupadas.

3.7 Análise de infiltrado Tumoral através de imunofenotipagem por citometria de fluxo.

A identificação de moléculas na superfície ou no interior das células, através da utilização de anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos ou substâncias fluorescentes, ambos capazes de emitir cor, é a base da imunofenotipagem por citometria de fluxo. A identificação de determinadas moléculas, presentes na superfície dos leucócitos, conhecidas como cluster de diferenciação (CD) tem sido utilizado para diferenciar as subpopulações de leucócitos. Os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo, marcados diretamente, são capazes de reconhecer e se ligar aos CDs das subpopulações de leucócitos. O princípio básico da citometria resume-se no emprego de uma radiação laser direcionada, que excita os fluorocromos presentes nas células e emitem um comprimento de onda (cor) que é detectado por um sensor, chamado de fotomultiplicadores (PMTs) capazes de converter a luz captada em sinais eletrônicos, que são enviados ao computador, possibilitando, através de software específico, uma análise multiparamétrica para obtenção dos resultados. Esta análise é realizada através de representações gráficas da intensidade de fluorescência emitida pelo fluorocromo e as respectivas características morfológicas das células (MARTI et al., 2001). Uma das grandes vantagens da citometria de fluxo é a possibilidade de análise celular individual, além disto, esta técnica permite ainda a separação rápida e purificada de uma suspensão heterogênea de células – processo denominado Sorting. Para a análise das células no citômetro é necessário que as mesmas estejam em suspensão. Um dos melhores métodos de dissociação celular em tecidos frescos de acordo com (VAN DAM et al., 1992) é a dissociação mecânica, pois, gera poucos debris celulares e preservação da expressão das proteínas.

Para nossa análise, células do tecido tumoral dos animais do grupo controle (WT) e deficientes de Nox1 foram coletadas após eutanásia dos animais feita depois de15 dias da inoculação do tumor. Todas as preparações de células foram feitas usando 1x solução de Hanks gelado com 15 mM de HEPES (pH 7,4), 0,5 U/mLDNase I e 5% FBS. As células do tecido tumoral foram obtidas por dissociação mecânica utilizando pinça e navalha seguida de digestão enzimática utilizando colagenase I e IV (1mg/mL), no tampão descrito acima em um ThermoMixer a 37°C por 15-20min. As células do baço, utilizadas para preparar os sigle color control, foram obtidas por dissociação através de uma malha metálica de 70µm e lise de células vermelhas com solução hipotônica (cloreto de amônio-potássio).

As suspensões celulares obtida foram filtradas através de malha fina de aço (40 µm) para retirada de debris e pequenos fragmentos não dissociados e lavadas com o tampão Hanks descrito acima.

A viabilidade celular das amostras de tumor sólido foi verificada pela técnica de contagem na câmara de Neubauer, pipetando 10µl da suspensão acondicionados em eppendorf contendo 90 µl de azul de tripan.

Para cada amostra a ser analisada foram utilizadas 5.10^6 células que foram incubadas com os anticorpos já conjugados com fluorcromo (listados na tabela 4) por 20 minutos em gelo. Após a marcação as células foram lavadas com tampão Hanks estéril, centrifugadas, filtradas utilizando ponteiras com lã de nylon estéreis e ressuspensas em 300µl de tampão.

As amostras foram adquiridas por Citometria de fluxo pelo FACSCanto II BD, onde 30.000 a 50.000 eventos foram adquiridos. Durante a aquisição de dados, os detritos e doublets foram excluídos. Os dados obtidos foram analisados com o software FlowJo versão 5.0.

Painel	Anticorpos	Fluorocromos
Leucócitos	CD45	APC (aloficocianina)
Macrófagos totais	F4/80	PerCP-Cy5-5 (complexo proteinaclorofina peridinina-Cy5-5)
Macrófagos M2	CD 206	FITC (fluoreceína)
Macrófagos M1	CD11c	Pacif Blue
Linfócitos CD8+	CD8	PE-A (ficoeritrina)
Granulócitos	Ly6G	PE-CY7 (ficoeritrina-Cy7)

Tabela 4. Painel de anticorpos utilizados para citometria de fluxo

3. 8 Análise Estatística

Os dados obtidos foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM) para valores de n amostras. A análise estatística foi realizada via Teste “t” de Student, não pareado (software Prism 5.0). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Nox1 do hospedeiro contribui para o crescimento tumoral do melanoma

Inicialmente foi avaliado se a NADPH oxidase Nox1 do hospedeiro favorece o crescimento tumoral. A análise dos tumores formados, após inoculação, via subcutânea, de células tumorais B16F10 em camundongos C57bl/6 WT e Nox1-/-, demonstraram um menor crescimento tumoral nos animais Nox1-/- em relação ao WT (Figura 9). Sugerindo, portanto, que Nox1 do hospedeiro é necessária para o crescimento tumoral.

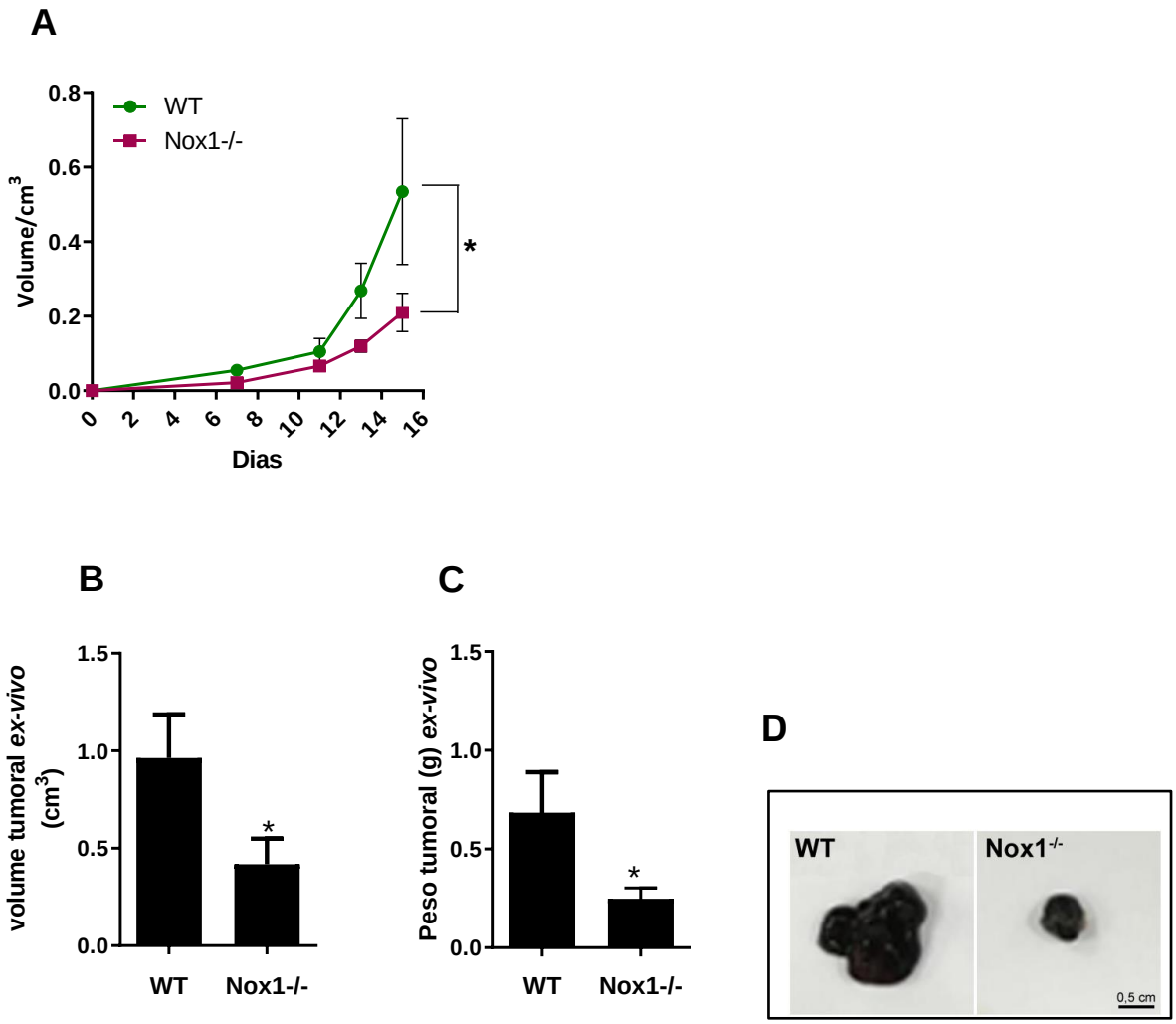


Figura 9. O crescimento tumoral do melanoma é menor nos animais deficientes de Nox1-/-. **A.** Quantificação do volume (cm^3) tumoral, realizado *in vivo* utilizando paquímetro a cada 48-72 horas WT vs Nox1-/-. V= $(D1)^2$ x D2 x 0,52, sendo que as medidas D1 e D2 se referem ao maior e o menor diâmetros perpendiculares, respectivamente. **B.** O volume do tumor em ambos os grupos experimentais foi medido *ex vivo* no final do experimento. **C**. O peso (g) do tumor em ambos os grupos experimentais foi medido *ex vivo* no final do experimento. **D.** Tamanho do tumor após 15 dias de inoculação WT vs Nox1-/-. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão, n=12 (cada grupo). *$p<0.05$ vs WT.

4.2 Nox1 do hospedeiro não interfere na ativação da via do EGFR tumoral.

Analisamos as vias de sinalização redox dependentes nos tumores para compreender se as Nox1 do hospedeiro suportaria o crescimento do tumor ativando estas vias. Foram determinadas a fosforilação de EGFR e ativação das vias de sinalização downstream deste receptor, MAPK (ERK 1/2, p-38 e JNK), STAT3 e AKT. Nenhuma mudança significativa na ativação dessas vias foi observada.

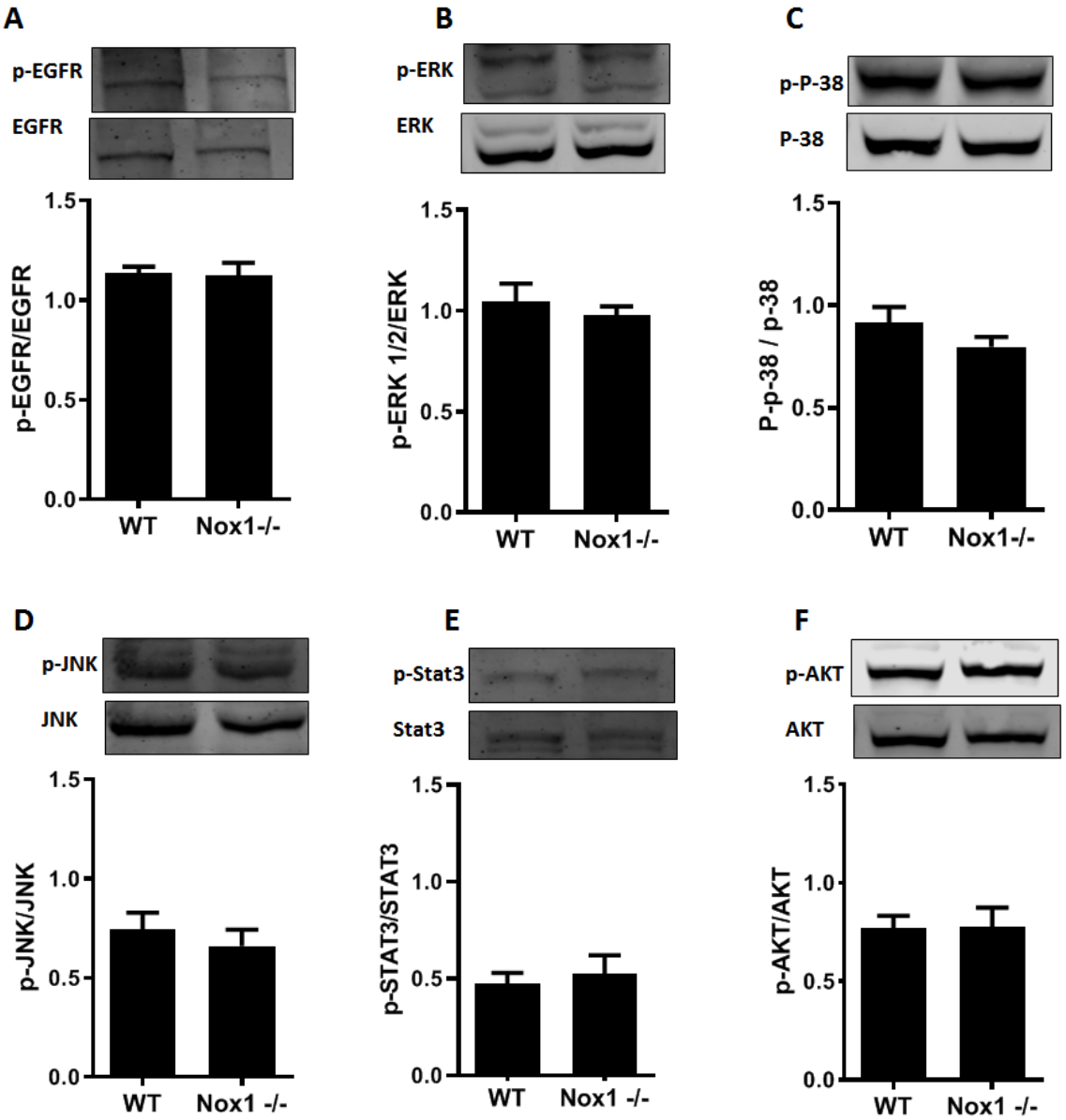


Figura 10. A deficiência de Nox1 não altera a sinalização MAP quinase redox dependente nos tumores. Nível total e fosforilado: **A.** EGFR, **B.** ERK 1/2, **C.** p-38, **D.** JNK, **E.** STAT3, **F.** AKT. A quantificação foi normalizada em cada transferência pelos níveis totais. As transferências foram medidas por densitometria. A normalização foi feita pela expressão total pois o objetivo foi verificar se havia alteração na atividade das proteínas destas vias e não na expressão (normalização pela beta actina). n=6.

4.3 Células B16F10 apresentam uma maior expressão de Nox1

Verificamos o padrão de expressão de Nox1 e Nox4, por PCR em tempo real, na linguagem B16F10 que seria inoculada no camundongo. A expressão destas isoformas de NADPH oxidases foi investigada tendo em vista que diversos estudos apontam o envolvimento destas enzimas na progressão tumoral. O resultado demonstra uma maior expressão de Nox1 em relação a Nox4 nas células B16F10.

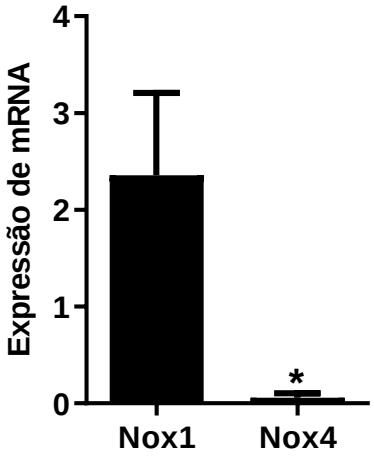


Figura 11. Células B16F10 apresentam uma maior expressão de Nox1. Análise por qPCR de mRNA de Nox1 e Nox4 nas células B16F10. GAPDH foi utilizado como gene de referência e uma amostra foi utilizada como calibrador. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão. n=3 (para cada grupo), * $p < 0.05$.

4.4 A deficiência de Nox1 do hospedeiro diminui a expressão gênica de Nox1 e Nox4 nos tumores de camundongos deficientes de Nox1 (Nox1-/-).

Verificamos o padrão de expressão de Nox1 e Nox4, por PCR em tempo real, nos tumores após eutanásia. Nós constatamos uma menor expressão tanto de Nox1 como de Nox4 nos tumores dos camundongos deficientes em Nox1 em comparação com os WT. Demonstrando, portanto, que as ROS do microambiente podem regular a expressão destas enzimas nos tumores.

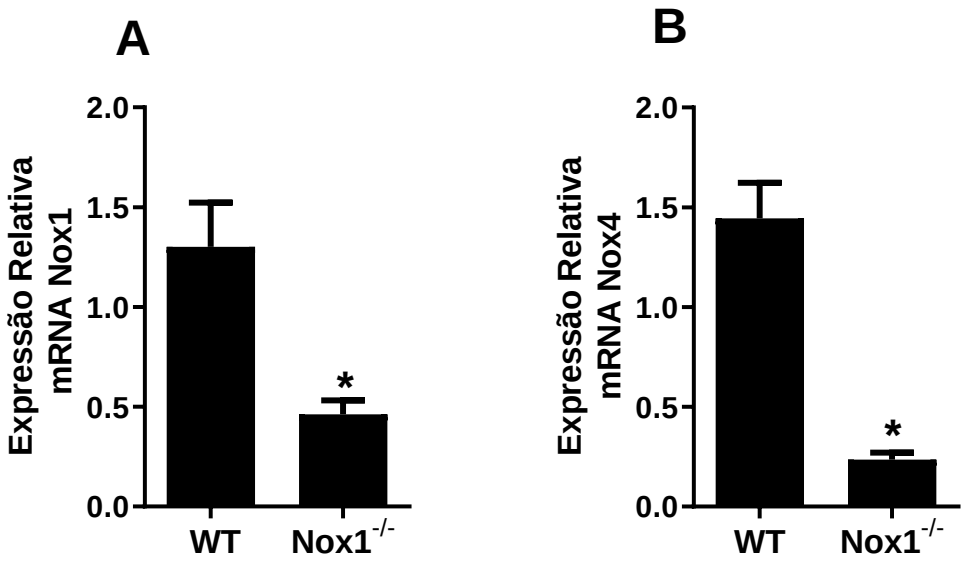
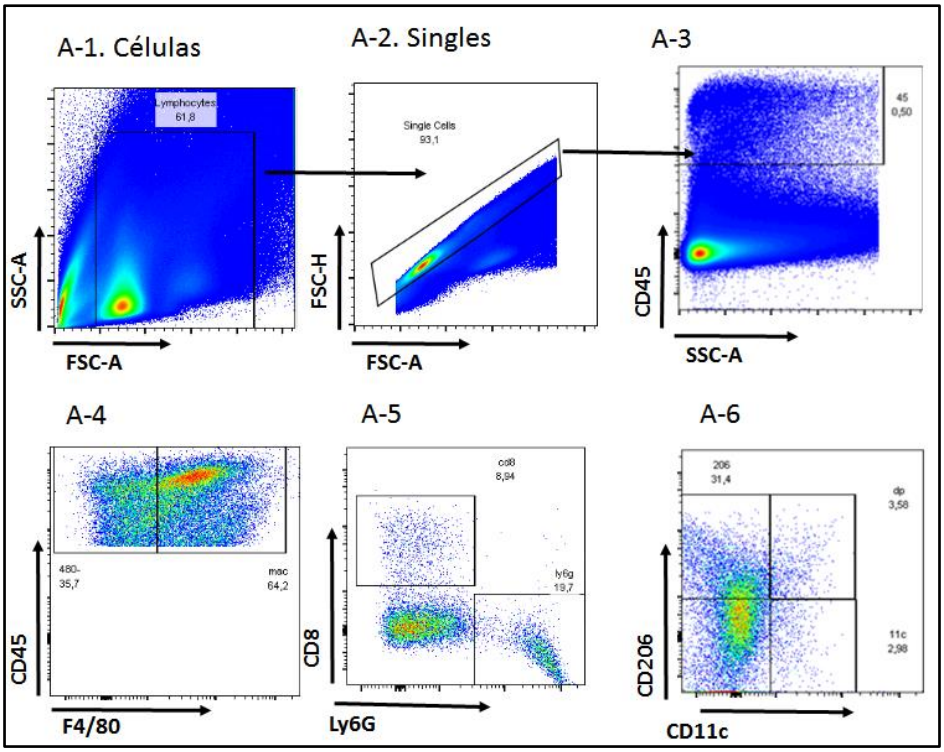


Figura 12. Nox1 e Nox4 apresentam expressão reduzida nos tumores dos animais deficientes de Nox1. **A** (Nox1) e **B** (Nox4), expressão de mRNA nos tumores dos animais WT e Nox1-/-. GAPDH foi utilizado como gene de referência e um animal do grupo WT foi utilizado como calibrador da amostra. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão. n=6. * $p < 0.05$ vs WT.

4.5 A deficiência de Nox1 do hospedeiro não altera as populações de células do infiltrado tumoral em ambos os grupos.

Avaliamos se a deficiência de Nox1 do hospedeiro afetaria as populações de células do infiltrado tumoral. Foi feita caracterização fenotípica, por citometria de fluxo. Esta caracterização inclui a análise básica de três parâmetros celulares: tamanho (determinado pela difração do raio laser – “Forwards catter” - FSC), granulosidade ou complexidade interna (determinada pela refração e reflexão do raio laser – “Side Scatter” - SSC), e intensidade relativa de fluorescência. Nenhuma diferença significativa nas populações de células do infiltrado tumoral foi observada entre os grupos.

A - WT



B - Nox1-/-

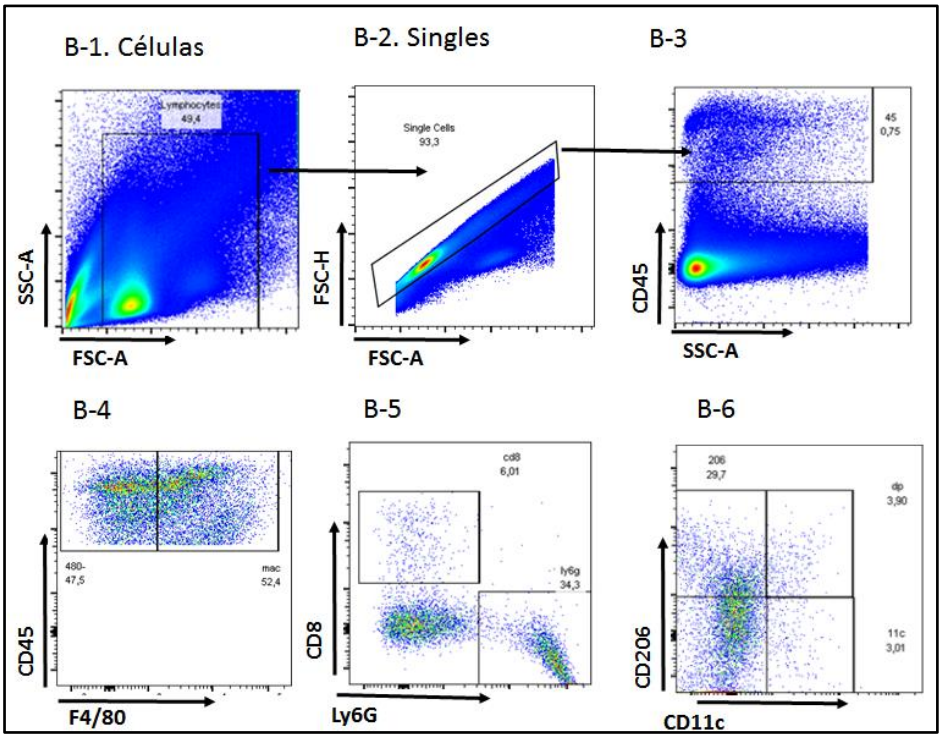


Figura 13– A e B. Estratégias de gates do Infiltrado tumoral no melanoma B16F10. **A**, WT. **B**, Nox1-/-. **A-1 e B-1**, Suspensões de células tumorais individuais totais, granulosidade (SSC) x tamanho FSC. **A-2 e B-2**, exclusão de doublets. **A-3 e B-3**, análise representativa das populações de leucócitos totais ($CD45^+$). **A-4 e B-4**, análise representativa das populações de macrófagos totais ($F4/80^+$). **A-5 e B-5**, análise representativa das populações de linfócitos CD8+ e de granulócitos (Ly6G). **A-6 e B-6**, análise representativa das subpopulações de macrófagos M1 (CD11c) e M2 (CD 206). Foram adquiridos 50.000 eventos, n=5 (para cada grupo).

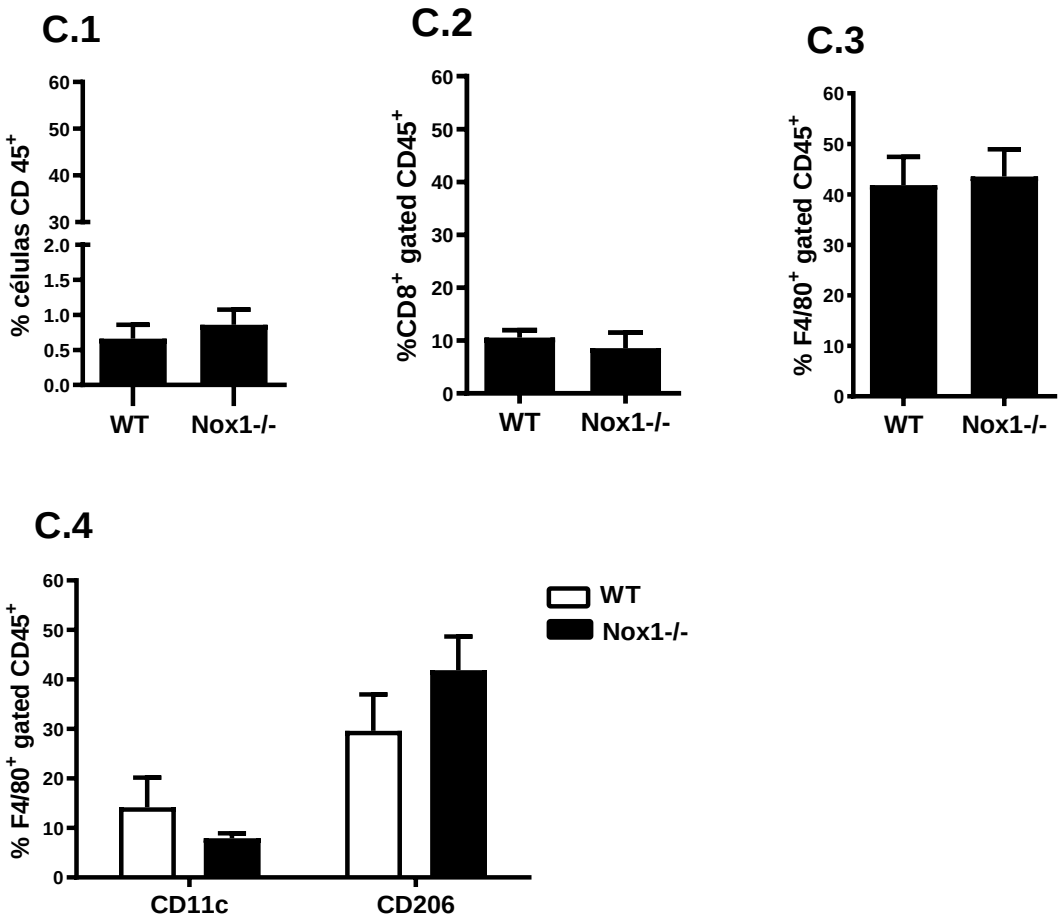


Figura 13C. A deficiência de Nox1 não afeta as células inflamatórias do tumor. Os tumores foram isolados e as células do infiltrado tumoral: leucócitos ($CD45^+$) **(C-1),** linfócitos ($CD45^+/CD8^+$) **(C-2)**, macrófagos ($CD45^+/F4/80^+$) **(C-3)**, macrófagos M1($F4/80^+/CD11c^+$) e M2 ($F4/80^+$, $CD206^+$) (**C-4**), foram analisados por citometria. n=5 (para cada grupo).

4.6 A deficiência de Nox1 do hospedeiro diminui a angiogênese tumoral

Investigamos se havia alteração na angiogênese tumoral verificando a densidade microvascular, por imuno-histoquíma, e pela determinação da expressão gênica do fator de crescimento endotelial vascular VEGF. Nossos resultados demonstram que a deficiência de Nox1 do hospedeiro diminuiu a angiogênese nos animais Nox-/-.Verificado pela menor densidade microvascular e menor expressão do VEGF, nestes animais.

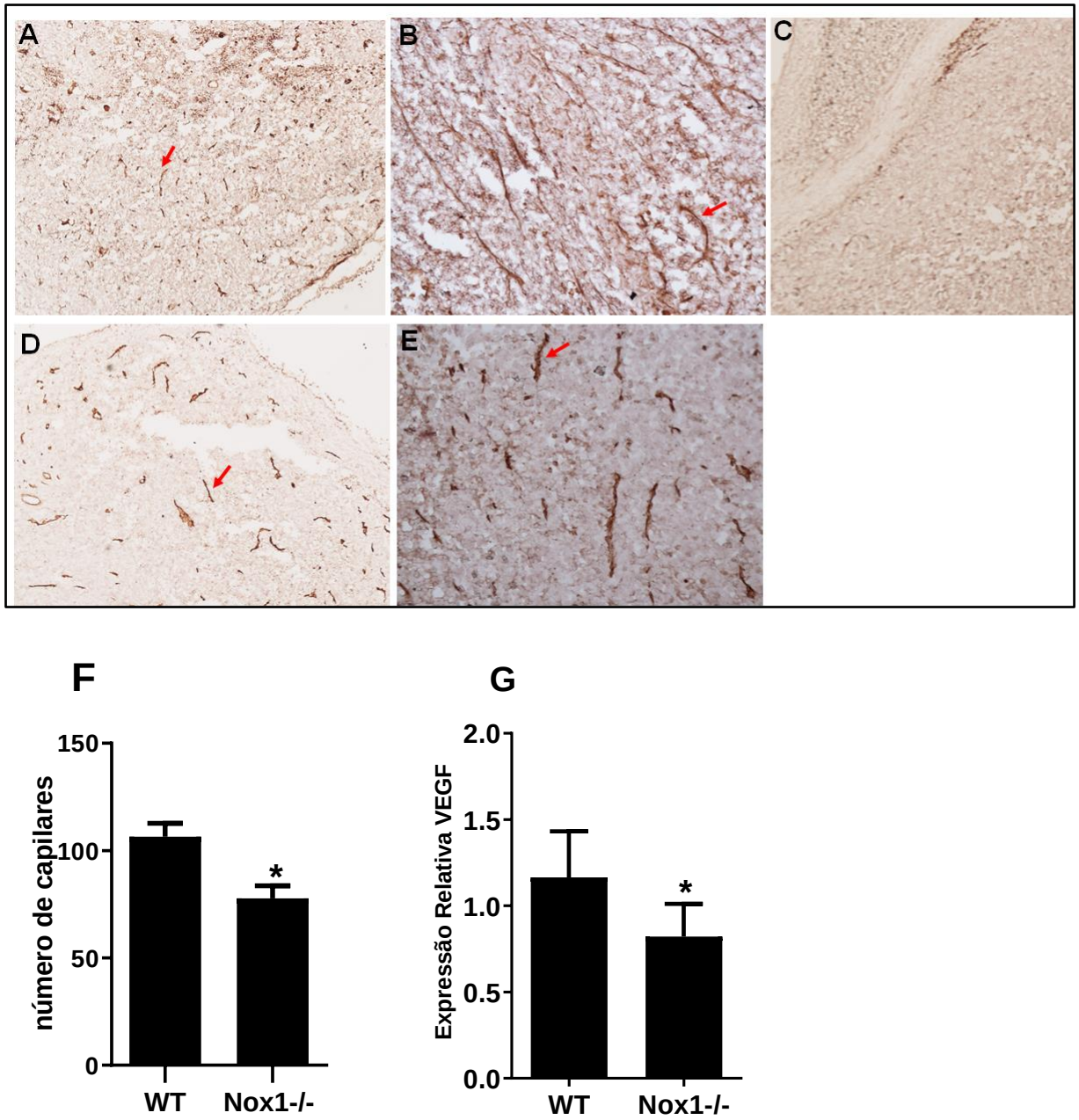


Figura 14. A deficiência de Nox1 reduz a angiogênese tumoral. Imuno-histoquímica de CD31 em WT (**A** e **B**) e Nox1-/- (**D** e **E**). **A e D**, com aumento de 40x, **B** e **E** com aumento de 100x. **C**, controle negativo. **F**. Os dados representam a análise de densidade óptica de 3 campos em cada grupo. **G**, expressão de mRNA de VEGF em WT e Nox1-/-. GAPDH foi utilizado como gene de referência e um animal do grupo WT foi utilizado como calibrador da amostra. n = 4 para CD31 e n = 6 (cada grupo) para VEGF. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão. *p<0.05 vs WT

4.7 A deficiência de Nox1 do hospedeiro promove parada do ciclo celular em G1.

Em seguida, investigamos se a Nox1 do hospedeiro contribui para o crescimento tumoral favorecendo a transição das células da fase G1 para a fase S do

ciclo celular, e assim, promovendo a proliferação celular. Para isso determinamos a expressão gênica da ciclina D1 e expressão proteica de Ciclina E, p21 e p27. Os camundongos deficientes de Nox1 apresentaram aumento da expressão gênica da ciclina D1, aumento da expressão proteica de p21, p27 e diminuição da expressão proteica de ciclina E, isto levou a uma parada do ciclo em G1. Demostrando, portanto, que a deficiência de Nox1 do hospedeiro interfere na homeostase das ROS do microambiente necessárias para a progressão do ciclo celular.

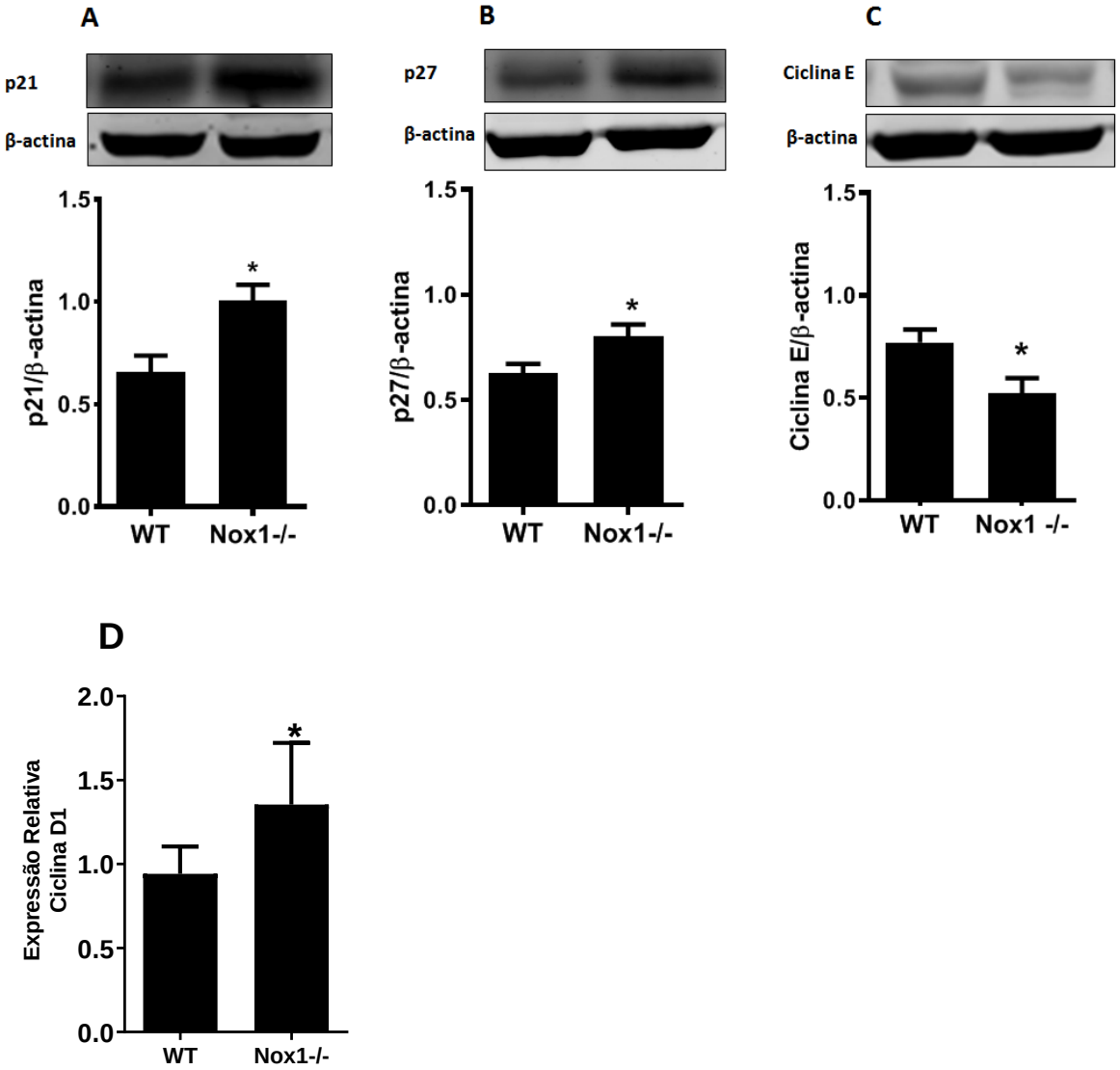


Figura 15. A deficiência de Nox1 provoca parada do ciclo celular em G1 nestes tumores. Os lisados de tecido foram submetidos a análise de western blot para expressão protéica de p21 (A), expressão proteica de p27 (B), expressão proteica de E (C). A β-actina foi utilizada como controle de carregamento. As transferências foram medidas por densitometria. As densidades das transferências de p21, p27 e Ciclina E foram normalizadas pela β-actina, para obter uma densidade relativa de transferência. **D**, análise por qPCR de mRNA de ciclina D1. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e um animal do grupo WT foi utilizado como calibrador da amostra. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão, n=4 (para cada grupo). *$p<0.05$ vs WT.

4.8 A deficiência de Nox1 do hospedeiro não promove menor crescimento tumoral por apoptose.

Avaliamos se a deficiência de Nox1 do hospedeiro teria provocado menor crescimento tumoral por aumento da apoptose nos tumores. Entretanto não houve diferença na expressão gênica das proteínas antiapoptóticas BCL2 e pró-apoptóticas Bax, entre os grupos experimentais.

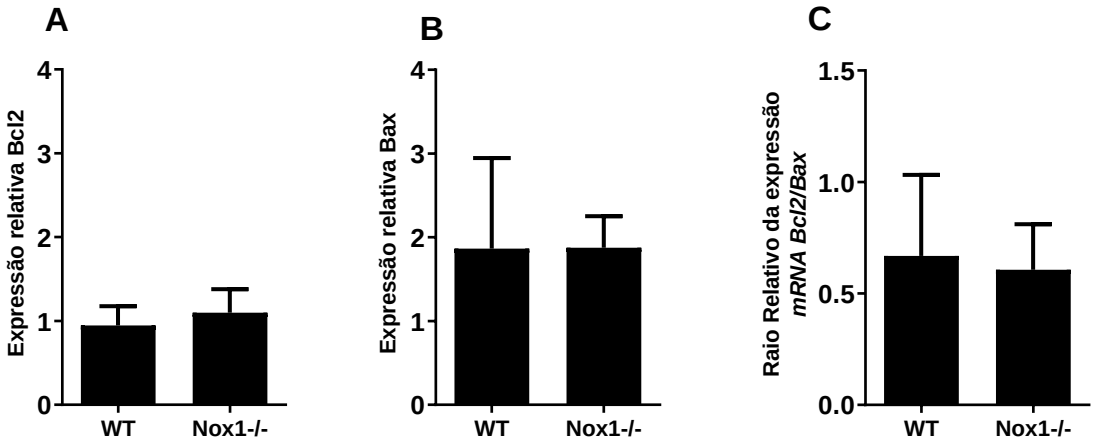


Figura 16. A redução do crescimento tumoral nos camundongos deficientes de Nox1 não é causada pelo aumento da morte celular. **A**, expressão de mRNA de Bcl2.**B**, expressão de mRNA de Bax. **C**, Análise da relação Bcl-2/Bax. O GAPDH foi utilizado como gene de referência e um animal do grupo WT foi utilizado como calibrador da amostra. n=6 (para cada grupo). Os dados estão apresentados como média ± erro padrão.

.

5 DISCUSSÃO

Alterações no estado redox celular fazem parte de mecanismos que a célula utiliza para integrar informações e coordenar complexas vias de sinalização envolvidas na progressão tumoral. Um modelo atual estabelece que um nível elevado de ROS nas células cancerígenas pode contribuir para alterações bioquímicas e moleculares necessárias para a iniciação, promoção, progressão e quimiorresistência do tumor (GALADARI et al., 2017). Com base em vários estudos que mostraram que a expressão de Nox1 e Nox4 em células de melanoma promove o crescimento deste tumor, focamos nossos estudos em investigar o papel da Nox1 do hospedeiro no crescimento do melanoma *in vivo,* utilizando camundongos deficientes de Nox1.

Nossos resultados experimentais demonstraram um crescimento tumoral menor nos camundongos deficientes de Nox1 em comparação com o grupo WT, entretanto as células inoculadas nestes animais continham Nox1 ativas que poderiam contribuir para o crescimento tumoral. Além de apresentar menor crescimento tumoral, os camundongos deficientes de Nox1 apresentaram tumores com crescimento delimitado, ao passo que nos animais WT o tumor cresceu disperso. Nossos resultados demonstram que as Nox1 do hospedeiro são fundamentais para o crescimento do melanoma, e vão ao encontro de estudos anteriores que mostraram resultados semelhantes (GARRIDO-URBANI et al., 2011; STALIN et al., 2019). A deficiência de Nox1 no hospedeiro interfere na homeostase das ROS do microambiente tumoral necessárias para ativação de vias de sinalizações que promovem o crescimento tumoral.

As NADPH oxidases são importantes moduladores da liberação de vários fatores de crescimento relacionados ao crescimento tumoral. Nox1 aumenta a expressão de VEGFR e VEGF (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; NAUMOV et al., 2006; SANCHO; FABREGAT, 2010). Diante disto, investigamos se Nox1 do microambiente tumoral suportaria o crescimento do tumor ativando vias de crescimento redox dependentes no tumor. Para isto analisamos a fosforilação do EGFR e ativação das vias de sinalização *downstream* deste receptor. Entretanto nós não encontramos alteração significativa na fosforilação do EGFR. Os estudos sobre a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) no melanoma e seu papel na biologia deste tumor são conflitantes. Alguns autores como DE Wit et al.

(1992) e Sparrow e Heenan (1999) indicam uma alta expressão de EGFR em melanoma, com um aumento gradual da expressão em vários estágios de progressão do tumor, ao passo que autores como Boone et al.(2011) e Gross et al. (2015) observaram uma taxa muito menor de expressão de EGFR em linhagens de melanoma. Portanto, há um grau variável de expressão deste receptor em células de melanoma (GORDON-THOMSON; MASON; MOORE, 2001). Possivelmente, a sinalização mediada por EGFR não deve ser essencial para o crescimento do melanoma, levando-se em consideração que, neste tumor, as vias de sinalização *downstream* deste receptor podem ser ativadas por mutações em BRAF e NRAS (GARAY et al., 2015; GROSS et al., 2015). Essas mutações estimulam constitutivamente MEK e ERK, e assim promovem a transformação de melanócitos em células de melanoma (MILLER; MIHM, 2006).

Estes dados demonstram que Nox1 do microambiente tumoral não promove o crescimento do melanoma por ativação da via do EGFR nas células tumorais, sugerindo que Nox1 do microambiente promove o crescimento do melanoma por ativação de outras vias. Estudos feitos por Adachi et al. (2016) e Czyz (2018) com células de melanoma B16F10, demonstraram que estas células expressam o receptor do fator de crescimento do hepatócito (HGFR, também conhecido como c-Met) na superfície celular e que a fosforilação desta proteína pode ocorrer de forma independente de HGF. Outro estudo realizado com as mesmas células (B16F10) demonstrou que a ativação de c-Met induz crescimento independente de ancoragem destas células, via ERK, dependente de ROS mediada por Rac-1. A geração de superóxido mediada por Rac-1 nas células B16F10 foi induzida por c-Met (FERRARO et al., 2006). Como a Nox1 pode ser ativada através da GTPase Rac-1, é provável que a via do receptor c-Met juntamente com ativação de Nox1 seja uma possível via de crescimento para o melanoma B16F10.

A ativação das vias de sinalização *downstream*, isto é a jusante, do EGFR, também foram analisadas. Analisamos a via RAS/RAF/MEK/ERK, a via PI3/AKT, JNK e STAT3. Estas vias estão frequentemente interligadas funcionalmente e idealmente não devem ser consideradas isoladamente. Entretanto nós não encontramos diferenças significativas na ativação destas vias. Os cânceres que apresentam mutações em Ras e B-Raf exibem ativação constitutiva da via ERK 1/2 e AKT. No melanoma as mutações no gene BRAF são observadas em 50% -70% das linhas

celulares e tumores, já as mutações em N-RAS são observadas em cerca de 25% das linhagens celulares (HALILOVIC; SOLIT, 2008; UGUREL et al., 2007). Entretanto o melanoma B16F10 não apresenta mutações em B-RAF e N-RAS o que pode justificar a ausência de alterações significativas na ativação das via ERK 1/2 e AKT nestes tumores (CASTLE et al., 2012). Estudos de Garay et al.(2015) demonstraram uma pequena alteração da fosforilação de ERK 1/2 em células de melanoma com mutações em BRAF e NRAS quando comparadas com células selvagens. Ranjan et al.(2006) ao analisar a fosforilação de ERK 1/2 e AKT, em células epiteliais de pulmão de camundongos, com expressão estável de Nox1, expostas ao inibidor de NADPH oxidase, DPI (Difenileno-iodônio), não observou alteração nos níveis de fosfo-ERK e AKT, detectados por immunoblotting. Nossos resultados foram semelhantes, pois não houve alteração da fosforilação destas vias nos animais deficientes de Nox1.

Nos tumores durante a transição para um fenótipo maligno, as ROS derivadas de NADPH Oxidases, Nox1 e Nox2, ativam as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), incluindo as vias ERK, JNK e p38, levando à expressão de MMPs para invasão e metástase de tumores (BANSKOTA; REGMI; KIM, 2015; PARK et al., 2014), baseado nisto, decidimos investigar se havia alteração na ativação de outros componentes da via MAPK. Avaliamos se havia alteração na ativação da via p-38 e JNK. Entretanto nós não encontramos diferenças significativas na ativação destas vias. A função da via p-38 e JNK é complexa. Algumas células utilizam estas vias de sinalização para antagonizar a proliferação e transformação celular, entretanto as células cancerígenas podem utilizar esta via para facilitar a proliferação, sobrevivência e invasão. Portanto, estas vias podem funcionar como supressoras ou promotoras do tumor em diferentes tipos de células (WAGNER; NEBREDA, 2009).

Avaliando a expressão dos genes de Nox1 e Nox4, nos tumores, nós observamos que a deficiência de Nox1 do hospedeiro levou a uma menor expressão tanto de Nox1 quanto de Nox4 nos tumores destes animais (Nox1-/-) quando comparados com o grupo WT. Demonstrando, portanto, que as ROS do microambiente podem estar envolvidas com a regulação da expressão de Nox1 e Nox4 nos tumores. Isto contribuiu para um menor crescimento tumoral nos camundongos deficientes de Nox1 e está de acordo com estudos que apontam o envolvimento destas NADPH oxidases em diversos aspectos da progressão tumoral do melanoma (LIU; GOMEZ GARCIA; MEYSKENS, 2012; PARASCANDOLO;

LAUKKANEN, 2019; PRASAD; KAPPES; KATIYAR, 2016; TEIXEIRA et al., 2017). A deficiência de Nox1 no hospedeiro interfere na homeostase redox do microambiente tumoral, interferindo no seu estado de oxidação, e isto afeta a expressão tanto de Nox1 como de Nox4 nestes tumores. De fato, um estudo feito por Stanic, Katsuyama e Miller (2010) demonstraram que um estado redox extracelular oxidado (Eh) aumenta a expressão de Nox1 e induz a proliferação de células musculares lisas vasculares dependentes de Nox1. Garrido-Urbani et al. (2011) demonstraram que a inibição de Nox1 em células endoteliais comprometeu drasticamente a produção de ROS, em resposta a estimulação com VEGF ou bFGF, em contraste a inibição de Nox4 não afetou a produção de ROS mediante o mesmo estimulo. Portanto, a deficiência de Nox1 do hospedeiro altera a homeostase das ROS do microambiente afetando a expressão de Nox1 e Nox4 nos tumores e comprometendo o crescimento tumoral, pois, os estudos apontam que nos tumores tanto células tumorais como estromais produzem quantidades substanciais de ROS e fatores de crescimento que podem estimular o crescimento e a vascularização do tumor (KIM; BYZOVA, 2014; WHEELER; SMUTNEY; JUDE SAMULSKI, 2003).

Uma maneira pela qual as ROS podem favorecer a progressão tumoral é através da supressão de células imunes do microambiente tumoral. Altos níveis de ROS no microambiente tumoral inibem a proliferação de células T e sua função antitumoral (WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019). Estudos feitos em células de carcinoma do cólon murino, C26, co-cultivadas com macrófagos demonstraram que os macrófagos associados ao tumor são importantes contribuintes na produção dos níveis proliferativos de ROS no microambiente do carcinoma. A atividade de NADPH oxidase de membrana plasmática do macrófago contribui para os efeitos estimulatórios destas células sobre a proliferação de células C26, principalmente via aumento da produção de proteína pró-angiogênica no microambiente tumoral. A inibição de NADPH oxidase utilizando o inibidor apocinina reduziu os níveis de todas as proteínas angiogênicas testadas nos lisados de co-cultura celular (LUPUT et al., 2017). Nox1 e Nox2 são as principais NADPH Oxidases expressas em monócitos e macrófagos derivados da medula óssea de camundongos, C57BL/6, enquanto que Nox4 é expressa em baixos níveis (XU et al., 2016).

Diante das evidências de que as ROS podem regular a atividade das células imunes do microambiente, investigamos se havia alteração no infiltrado tumoral entre

os grupos. Nossas análises do infiltrado tumoral por citometria de fluxo demonstraram que a deficiência de Nox1 não afetou a população total de macrófagos (F4/80+), nem as populações de macrófagos M1(CD11c) e M2 (CD206) e tampouco as populações de linfócitos CD8+ nesses animais quando comparados ao grupo WT.

Estudo feito por Xu et al. (2016) demonstraram que Nox1 e Nox2 são necessárias durante a diferenciação de monócitos para macrófagos e que estas enzimas são predominantemente responsáveis pela produção de ROS necessárias em monócitos sob diferenciação (tratados com M-CSF). O nocaute duplo de Nox1 e Nox2 afetou significativamente a diferenciação de monócitos para macrófagos, induziu a polarização de macrófagos em direção ao fenótipo pró-inflamatório M1 e afetou a polarização para M2 quando comparados ao grupo WT. Entretanto a deleção de Nox1 ou Nox2 sozinhos não afetou significativamente a diferenciação e polarização dos macrófagos. Portanto, este estudo mostrou que é necessário o nocaute duplo Nox1 e Nox2 para afetar a diferenciação e polarização dos macrófagos, a partir de monócitos derivados da medula de camundongos C57BL/6. Este nocaute duplo também diminuiu potencialmente a ocorrência de TAMs (macrófagos associados ao tumor) semelhantes a M2 e inibiu o crescimento tumoral, em modelo tumoral de células LLC (leucemia linfoide crônica) de camundongos inoculadas subcutaneamente.

Estudo recente feito por Stalin et al. (2019) demonstrou que a inibição de Nox1, utilizando um inibidor específico de Nox1 o GKT771, não afetou a população total de macrófagos (F4/80). E embora tenha aumentado de forma significativa o número de macrófagos pró-inflamatórios MHC classe II +/Ly6C+ tipo I, em tumores colorretais MC38, esse aumento não foi essencial para o efeito antitumoral de GKT771. Ao analisar a contribuição de outras células do sistema imunológico, diferentes de macrófagos, para o efeito antitumoral de GKT771, os autores verificaram que o tratamento de tumores colorretais com GKT771 em camundongos imunodeficiêntes, que não possuíam linfócitos T, B e células NK, teve um efeito antitumoral menor e insignificante nesses animais. Demonstrando, portanto que o sistema imunológico do hospedeiro contribui substancialmente para o efeito antitumoral de GKT771.

Embora nossos resultados tenham demonstrado que a deficiência de Nox1 do microambiente tumoral, sozinha, não afetou significativamente o infiltrado tumoral global, o infiltrado de macrófagos e linfócitos CD8+, não podemos excluir a possibilidade de que a deficiência desta enzima crie uma condição crítica desfavorável

para o crescimento tumoral. A deficiência desta enzima no hospedeiro desequilibra o microambiente redox tumoral afetando a produção de ROS por estas células, incluindo células imunes, que são necessárias para estimular diversos processos e vias de sinalização envolvidas na progressão tumoral. Entre estes processos, se destacam o crescimento e a vascularização tumoral (KIM; BYZOVA, 2014; WHEELER; SMUTNEY; JUDE SAMULSKI, 2003), ao qual nos propomos a investigar.

A sobrevivência das células cancerígenas e também a capacidade de se espalhar para os tecidos adjacentes e distantes são dependentes do oxigênio e nutrientes fornecidos pela vasculatura. A angiogênese é um passo crítico para o desenvolvimento de tumores com diâmetro maior que ~2 mm, pois permite a entrega de nutrientes no tumor sólido. A formação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura existente é regulada por fatores de crescimento, como o VEGF, cuja expressão pode ser estimulada por ROS produzidos pelas células tumorais e por muitas células dentro do microambiente tumoral, como células vasculares, fibroblastos e macrófagos associados a tumores (TAMs) (BIELENBERG; ZETTER, 2015; FUKAI; NAKAMURA, 2008). O processo angiogênico requer a migração e proliferação de células endoteliais (CEs), mas para que isso ocorra, as CEs quiescentes precisam primeiro ser destacadas da membrana basal. A produção de ROS parece ser imprescindível em todo este processo, atuando como segundos mensageiros, que contribuem para a sinalização que leva à migração e proliferação das CEs (CRAIGE; KANT; KEANEY, 2015; PRIETO-BERMEJO; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, 2017).

É sabido que as ROS, superóxido e peróxido de hidrogênio, produzidas via ativação de NADPH oxidases vasculares são necessárias para a regulação do sistema vascular e estimulam diversas vias de sinalização redox associadas à estimulação da angiogênese (USHIO-FUKAI, 2006). Várias isoformas de Nox são expressas em artérias e células endoteliais (Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5) (GRIENDLING, 2004). De acordo com resultados de estudo *in vitro*, Nox1, Nox2 e Nox4 podem ativar a proliferação e a tubulogênese das ECs. Estudos *in vivo* também indicam que essas três isoformas de Nox estão implicadas na angiogênese. (WILKINSON-BERKA et al., 2013).

Estudo feito por Garrido-Urbani et al. (2011) com modelos *in vivo* mostraram que a deficiência de Nox1 em camundongos, mas não Nox2 e Nox4, prejudicou a angiogênese em implantes de matrigel carregados com bFGF. Nesse estudo os

autores demonstraram que Nox1 é necessária para migração e formação de novos tubos nas células endoteliais através da inibição da expressão e atividade de PPARα, um receptor nuclear de hormônio capaz de bloquear a atividade angiogênica de VEGF. Em um modelo de tumor com células de melanoma B16F0, inoculadas em animais deficientes de Nox1, esses autores observaram uma menor formação de vasos sanguíneos nos camundongos deficientes desta enzima. Juhasz et al. (2017) demonstraram em um modelo *in vivo* de xenoenxerto de células de câncer de cólon HT-29, nocautes de Nox1, uma diminuição na densidade dos vasos sanguíneos. Esta diminuição na angiogênese estava associada com uma profunda redução na expressão de uma ampla gama de genes pró-angiogênicos, incluindo VEGF. Esses estudos demonstram, portanto, que a Nox1 do tumor e do microambiente produzem e liberam ROS que conjuntamente estimulam a vascularização tumoral.

As NADPH oxidases vasculares respondem a vários fatores pró-angiogênicos, como o VEGF, por exemplo. Entretanto as NADPH Oxidases vasculares são importantes moduladores da liberação de vários fatores relacionados à angiogênese, redox sensíveis. Estes incluem VEGF-A, HIF-1α, p53 e metaloproteinases de matriz (MMPs). Nox1 aumenta a expressão de VEGFR e VEGF e a atividade da MMP, marcadores do “switch angiogênico”, promovendo assim a vascularização e a rápida expansão dos tumores. Também foi observado um aumento da expressão e atividade desta enzima durante o “switch angiogênico”, progressão espontânea de um fenótipo não angiogênico para um fenótipo angiogênico (ARBISER et al., 2002; GARRIDO-URBANI et al., 2011; NAUMOV et al., 2006). Estes resultados demonstram, portanto, que Nox1 é um importante regulador da angiogênese. Nossos resultados vão, portanto, ao encontro dos estudos que demonstram a importância de Nox1 para a angiogênese tumoral. De fato, demonstramos que a deficiência de Nox1 do microambiente tumoral interferiu na liberação de fatores, redox sensíveis, relacionados à angiogênese, como demonstrado pela menor expressão de VEGF nestes animais. E isto afetou a angiogênese tumoral nos animais deficientes de Nox1-/-.

Com relação a outras isoformas de Nox, Tojo et al. (2005) demonstrou que a deficiência de outra NADPH oxidase, Nox2, prejudica substancialmente a angiogênese induzida por VEGF, e que os ROS derivados desta NADPH oxidase são produzidas principalmente a partir de células inflamatórias. Em relação a Nox4, Craige

et al. (2011) demonstrou, em modelo de camundongos superexpressando esta enzima, um aumento da angiogênese. Zhuang et al. (2010) demonstraram que a ligação do VEGF ao VEGFR2 induz a dimerização do VEGFR2 e leva a produção de ROS, principalmente via Nox4, necessário para a autofosforilação de VEGFR2, promovendo mais angiogênese. Helfinger et al.(2016) demostraram em modelo de camundongos com fibrossarcoma, deficiente de Nox4, que Nox4 promove a angiogênese tumoral através da indução da expressão VEGF. Desta forma estes estudos nos permitem concluir que as ROS derivadas das enzimas NADPH oxidase participam da resposta angiogênicas nos tumores, especialmente Nox1 e Nox4. Portanto a redução da angiogênese tumoral no nosso modelo está possivelmente, não somente associada a deficiência de Nox1 do hospedeiro como também a redução da expressão de Nox1e Nox4 nos tumores.

Tendo em vista que a literatura demonstra que as ROS participam do processo de proliferação celular, investigamos como a Nox1 do hospedeiro colabora neste processo. Para isto avaliamos proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular. Neste contexto nossos resultados demostraram que a deficiência de Nox1 do hospedeiro afeta o estado redox do microambiente tumoral do melanoma que associado a menor expressão de Nox1 e Nox4 nos tumores alterou o potencial redox celular de proliferação nos tumores dos animais deficientes de Nox1. Oscilações periódicas no ambiente redox celular, um ciclo redox, regulam a progressão do ciclo celular da quiescência (G0) para a proliferação (G1, S, G 2 e M) e de volta à quiescência (BOONSTRA; POST, 2004; SARSOUR et al., 2009). O potencial redox nas células em proliferação é relatado como sendo de -240mV, as células necróticas exibem o maior estado de oxidação (-150mV); o potencial redox para as células quiescentes está entre os estados de proliferação e diferenciação (SARSOUR et al., 2009). A alteração no potencial redox celular de proliferação nos animais deficientes de Nox1 levou a uma parada do ciclo celular no início da fase G1. Constatado por um aumento da expressão gênica da ciclina D1, aumento da expressão proteica de p21, p27 e diminuição da expressão proteica de ciclina E.

As ciclinas juntamente com quinases dependentes de ciclina (CDKs) e proteinas inibitórias, estão envolvidas na regulação da progressão do ciclo celular. As ciclinas juntamente com as CDKs funcionam em estágios específicos do ciclo celular mitótico. Em resposta a estímulos mitogênicos, as células sintetizam ciclina D que se

associa às CDK4 e CDK6. A progressão pela fase G1 bem como a transição G1/S envolve a formação dos complexos ciclinas D-CDK4/6 e ciclina E/CDK2 que fosforilam sequencialmente a proteína retinoblastoma (pRb), inativando-a. Esta por sua vez libera o fator de transcrição E2F. Desta forma genes necessário para a entrada em S são transcritos. Na forma ativa a Rb, que se encontra hipofosforilada, sequestra os fatores de transcrição da família E2F, bloqueando sua atividade sobre os promotores de diversos genes vitais para o prosseguimento de G1 e passagem de G1/S. A progressão pela fase S e a transição S/G2 depende da ativação do complexo ciclina A2/CDK2. Na fase final do G2, a ciclina A2 ativa o CDK1 para facilitar o início da fase M e a ciclina B/CDK1 dirige a transição G2-M (ALEKSEENKO et al., 2010; CHOTINER; WOLGEMUTH; WANG, 2019). O ciclo celular pode ser regulado ajustando-se a expressão de ciclinas e CDKs, mas também pode ser regulado pela modulação da atividade de CDK. A atividade de CDK é controlada por fosforilação reversível, executada por fosfatases Cdc25, e também por inibidores de quinases dependente de ciclina (CKIs) que inibem a ativação de CDK por ligação aos complexos ciclina/CDK inibindo-os (ZOHNY et al., 2019). Dentre os CKIs, o CKI p27 se incorpora ao complexo ciclina D CDK4/6 ou ao complexo ciclina E/A CDK2, restringindo a iniciação da fase G1 e a transição G1/S, sendo, portanto, um regulador negativo crítico da progressão do ciclo celular (HENGST; REED, 1996; IBAÑEZ et al., 2012; ZHANG et al., 2015). A proteína p21 inibe vários complexos ciclinas/CDK como os complexos ciclina D/CDK4/6, ciclina E/CDK2, ciclina A/CDK1/2 e ciclina B/CDK1 (BOONSTRA; POST, 2004; HENGST; REED, 1996).

As quantidades e atividade de ciclinas e CDKIs específicas em cada fase do ciclo dependem das condições de estresse ambiental às quais as células são expostas. Uma ampla variedade de fatores externos, como fatores de crescimento, hormônios e ROS afetam diversas vias de sinalizações que estão envolvidas na progressão do ciclo celular, parada do ciclo celular ou apoptose. As ROS podem gerar uma multiplicidade de efeitos na transdução de sinal e na progressão do ciclo celular. Para uma determinada célula e do tipo de ROS, os efeitos dependem da quantidade de ROS e da duração da exposição das células às ROS. Uma exposição curta a doses relativamente baixas resulta em uma ativação ou melhoria das vias de transdução de sinal levando ao aumento da proliferação celular (BOONSTRA; POST, 2004; VERBON; POST; BOONSTRA, 2012). A exposição prolongada a baixa concentrações

de ROS resultará em prolongada ativação dessas vias de transdução de sinal, comparável aos efeitos dos fatores de diferenciação, o que resultará em uma parada em G1. Em concentrações mais altas e, possivelmente, dependendo da localização celular das ROS, pode ocorrer dano ao DNA, resultando em uma indução da atividade da p53 e, consequentemente, na expressão de p21 ou uma indução de p21 independente de p-53 via AP-1 ou Sp1, que são fatores de transcrição redox sensíveis, levando a parada do ciclo celular (BOONSTRA; POST, 2004; VERBON; POST; BOONSTRA, 2012). O peróxido de hidrogênio, pode estimular a transição G1-S através de uma via que envolve a regulação negativa de p27. A adição de peróxido de hidrogênio em linhagens de células mielóides NSF/N1H7 leva a uma degradação do inibidor p27, diminuindo a sua expressão e assim facilitando a transição G1-S (DENG; GAO; MAY, 2003).

Em concordância com a literatura nossos resultados demostraram que a interferência no estado redox do microambiente, devido a deficiência de Nox1 do hospedeiro, afetou a progressão do ciclo celular nestes tumores. Afetando como consequência a proliferação celular. De fato, estudos demonstraram que a Nox1 é importante para a proliferação celular. Nox1 é ativado por agonistas que estimulam o crescimento em cultura de células, como angiotensina II, hormônio tireoidiano, PDGF, prostaglandina F2α, trombina, entre outros (LASSEGUE; SAN MARTIN; GRIENDLING, KATHY K, 2012). A proliferação induzida por soro e PDGF está aumentada em células musculares lisas vasculares (VSMCs) de camundongos transgênicos de Nox1. Por outro lado, a inibição de Nox1 em VSMCs inibe a proliferação induzida por soro (SUH et al., 1999), hormônio tireoidiano (WANG; SUN, 2010) e PDGF (LEE et al., 2009). Nox1 estimula a proliferação celular de células C10 (pulmão de camundongos), em células ativamente em ciclo, reduzindo a necessidade de fatores de crescimento para manter a expressão da ciclina D1. A utilização de DPI, um inibidor da atividade Nox, bloqueou a proliferação de células C10 e bloqueou a expressão de ciclina D1 (RANJAN et al., 2006).

As ROS participam da regulação do ciclo celular atuando como segundo mensageiros sobre várias vias, como a do p21 e p27, as quais demonstramos em nossos resultados. É bem descrito que a redução da expressão destes inibidores facilita a transição G1-S. Em nossos resultados a inibição de Nox1 do hospedeiro afetou a concentração de ROS necessária para promover a inibição de p27,

promovendo aumento da expressão deste inibidor e como consequência parada do ciclo celular. Nosso resultado vai ao encontro de estudo que demonstra que o aumento da expressão de p27 leva ao bloqueio de transição da fase G1-S e a acumulação de células em G0/G1(HENGST; REED, 1996). Em células de melanoma o peróxido de hidrogênio promove inibição de p27 impedindo a parada do ciclo celular em G1 (IBAÑEZ et al., 2012).

Vários estudos (ESPOSITO et al., 1998; MCGRATH, 1998; RUSSO et al., 1995) apontam que as ROS desempenham um importante papel na indução do inibidor de quinase dependente de ciclina p21 com consequente parada do ciclo celular em G1. Nossos resultados propõe que a exposição prolongada das células de melanoma, nos animais deficientes de Nox1, a níveis subproliferativos de ROS desencadeou um aumento da expressão proteica de p21. Portanto, o aumento da expressão proteica dos CDKI p21 e p27, decorrente da deficiência de Nox1, resultou em parada do ciclo celular no início da fase G1. Isto explicaria o aumento de ciclina D1 e diminuição de ciclina E observado nesses animais quando comparados aos animais WT. A parada do ciclo celular no início de G1 restringiu o crescimento tumoral do melanoma B16F10 nos animais deficientes de Nox1, quando comparado aos animais WT. Nossos resultados corrobora com a literatura que demonstra que a inibição de NADPH oxidases, em células de fibroblastos humanos, utilizando difenileno-iodônio (DPI) promoveu prolongamento das fases G1 e em menor grau de G2 associado com aumento dos níveis de p27 e alterações no níveis de ciclina D1 e p21 (VENKATACHALAM et al., 2008).

Por fim, nós avaliamos se a redução no crescimento tumoral, nos camundongos deficientes de Nox1, estava associada com um aumento da apoptose, tendo em vista que alguns estudos (SANCHO; FABREGAT, 2010; SEO et al., 2011) apontam que Nox1 pode favorecer o crescimento tumoral por diminuição da apoptose. Para isto nós avaliamos a expressão dos genes relacionados a apoptose, Bax e BCL2. No entanto, não encontramos correlação com esta via, pois, nossas análises, não demonstraram alterações na expressão destes genes. Diversos estudos apontam que as proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1 são altamente expressas no melanoma, e que uma maior expressão de Bcl-2/Bax está correlacionada com uma resistência das células à apoptose (EBERLE; HOSSINI, 2008). A apoptose é governada pela família de proteínas BCL-2, que é composta de membros antiapoptóticos, BCL-2, BCL-xL, e

pró-apoptóticos, BAX e BAK. A subfamília pró-apoptótica ativa diretamente caspases ou aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial e, assim, induz a liberação de fatores apoptogênicos da mitocôndria que ativam as caspases. Em contraste, a subfamília antiapoptótica, sequestra a proforma das caspases ou previne a liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais, como o citocromo c. A heterodimerização entre membros pró-apoptóticos e antiapoptóticos leva à inativação biológica do complexo. Um desequilíbrio nas concentrações dessas proteínas é determinante para a morte celular em situações de estresse (ZAKERI et al., 2008). A análise da relação Bcl-2/Bax feita nos tumores nos grupos WT e Nox1-/- não demonstrou diferença entre os grupos, demonstrando que o menor crescimento tumoral no grupo Nox1-/- não teve relação com morte por apoptose. Nossos resultados estão consistente com estudos anteriores, mostrando que a inibição de Noxs leva à diminuição da proliferação de células tumorais sem induzir apoptose (YAMAMOTO et al., 2018).

Concluindo, neste trabalho, investigamos como a inibição de Nox1 do hospedeiro afetaria o crescimento tumoral do melanoma. A primeira constatação importante deste trabalho é que Nox1 do tumor não é suficiente para sustentar o crescimento tumoral do melanoma. Isto foi demonstrado pelo menor crescimento deste tumor nos animais deficientes desta enzima. Portanto, a expressão de Nox1 do hospedeiro é necessária para o crescimento tumoral do melanoma visto que nos animais WT o tumor cresceu mais.

Nossa segunda constatação é que Nox1 do hospedeiro participa da regulação do microambiente redox tumoral necessário para o crescimento do melanoma. Aqui nos demonstramos que a deficiência de Nox1 do hospedeiro afetou a homeostase das ROS do microambiente interferindo em processos que são redox regulados, como angiogênese e proliferação. Nox1 do microambiente contribui para a angiogênese do melanoma através da modulação da liberação de fatores pró-angiogênicos como demonstramos pela menor expressão de VEGF nos animais deficiente desta enzima. Esses animais também apresentam menor expressão de PLGF, que contribui para menor vascularização, estudo feito por (STALIN et al., 2019). Com relação a proliferação, Nox1 do microambiente contribui para manter o potencial redox necessário nas células em proliferação. A inibição desta enzima altera o potencial redox de proliferação levando a parada do ciclo celular no início de G1 por aumento de p21, p27 e diminuição de ciclina E nestes animais. Nós também constatamos que

um microambiente redox mais oxidado é necessário para manter a expressão de Nox1 e Nox4 nos tumores (figura 16). De fato, a alteração do estado de oxidação do microambiente pela inibição de Nox1 diminuiu a expressão destas enzimas.

Nossa última constatação é que a deficiência de Nox1 do microambiente, isoladamente, não foi capaz de afetar as células do infiltrado tumoral. Nox1 é expressa por várias populações de células imunes, incluindo macrófagos e linfócitos. Os macrófagos estão entre as células imunes cujo fenótipo é regulado pela expressão de Nox1. Entretanto nós não encontramos alterações significativas nas populações de macrófagos e linfócitos em ambos os tumores. Em contraposição aos nossos resultados, estudos de Stalin et al. (2019) em tumores colorretais mostraram que a deleção genética de Nox1 aumentou o número de macrófagos pró-inflamatórios nos tumores. E também que o uso de um inibidor específico de Nox1, GKT771, aumentou o número de células NKT que se infiltravam no tumor. Este estudo demonstrou que os efeitos antitumorais do GKT771 requerem um sistema imunológico intacto pois este composto promove efeitos imunomoduladores essenciais para sua atividade antitumoral.

Diante dos resultados mostrados com este trabalho, que Nox1 do hospedeiro contribui para a manutenção do microambiente redox e crescimento do melanoma, o presente estudo propõe uma nova perspectiva no tratamento do melanoma através do controle redox da doença, pela diminuição das ROS tumorais. No entanto, para que essa estratégia seja eficaz, ela deve ter como alvo as ROS quando promovem a proliferação em vez de apoptose no câncer. Entretanto as ROS podem exercer efeitos divergentes dependendo, da fonte de ROS, da suscetibilidade das células tumorais e imunes aos ROS e da fase de progressão do câncer. Aqui nós demonstramos que a inibição de Nox1 do microambiente afeta as ROS proliferativas interferindo com o crescimento tumoral. Portanto, o desenvolvimento de inibidores de Nox1 se mostra uma estratégia terapêutica promissora.

De fato, estudo utilizando inibidores de NAPH Oxidases, GKT136901 e GKT137831 que inibem Nox1/4 vêm mostrando resultados proeminentes. O GKT136901 demostrou uma redução do crescimento tumoral por um efeito antiangiogênico (GARRIDO-URBANI et al., 2011). E o inibidor GKT137831 diminui as ROS de maneira dose-dependente, mas não completamente (WIESEL et al., 2012).

Um desafio a ser superado para o avanço de uma terapia baseada na modulação redox tumoral específica é o desenvolvimento de inibidores específicos de NADPH Oxidases. Atualmente o único inibidor específico de Nox1 é o GKT771 que se encontra em testes pré-clínicos (GENKYOTEX, 2019). Isso explica por que alguns dos estudos que enfocam o papel das NADPH Oxidases no câncer utilizam a inibição genética, como foi proposto por nosso trabalho.

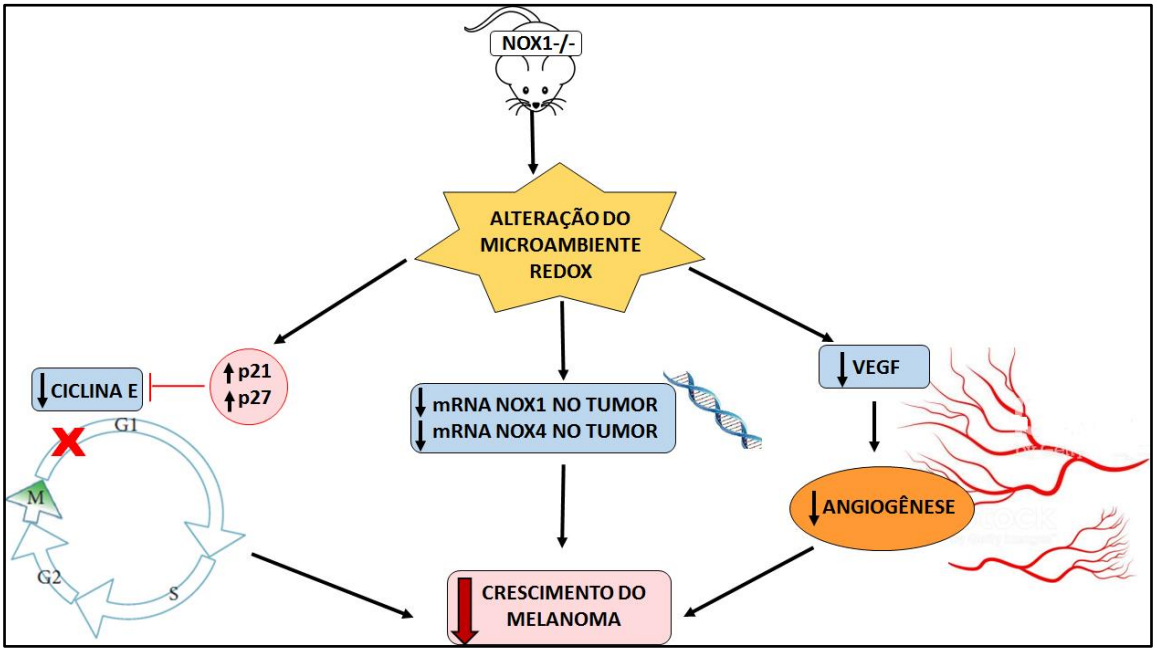


Figura 17. Representação esquemática de como a deficiência de Nox1 do hospedeiro interfere no crescimento tumoral do melanoma.

6 CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Nox1 do hospedeiro é necessária para o crescimento tumoral do melanoma tendo em vista que os animais deficientes desta enzima apresentaram menor volume e peso tumoral. De fato, o crescimento do melanoma em um microambiente com deficiência de Nox1 foi menor.

- Nox1 do hospedeiro é necessária para a angiogênese tumoral pois a sua deficiência diminui a liberação de fatores pró-angiogênicos (VEGF) reduzindo a angiogênese tumoral.

- A Nox1 do hospedeiro é necessária para a manutenção do microambiente redox do melanoma. De fato, a interferência no estado redox deste microambiente, devido a deficiência de Nox1, diminuiu a expressão gênica de Nox1 e Nox4 nos tumores dos camundongos deficientes desta enzima o que contribuiu ainda mais para a desregulação redox do microambiente.

- Nox1 do hospedeiro é necessária para a proliferação celular do melanoma. A sua deficiência interfere na progressão do ciclo celular por alterações nos níveis de ciclina D1, ciclina E, p21 e p27, resultando em parada do ciclo celular no início da fase G1.

- A deficiência de Nox1 do hospedeiro não altera a fosforilação do EGFR e a ativação de MAPK (ERK 1/2, p-38 e JNK), AKT e STAT3.

- A deficiência de Nox1 do hospedeiro não altera a expressão de fatores pró ou antiapoptóticos (BAX e BCL2).

- A deficiência de Nox1 do hospedeiro não altera as populações de células do infiltrado tumoral em ambos os grupos.

REFERÊNCIAS

ADACHI, E. et al. Different growth and metastatic phenotypes associated with a cell-intrinsic change of Met in metastatic melanoma. **Oncotarget**, v. 7, n. 43, p. 70779–70793, 2016.

ALEKSEENKO, A. et al. Cyclin D1 and D3 expression in melanocytic skin lesions. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, n. 7, p. 545–550, 2010.

ALEXANDRE, J. et al. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 119, n. 1, p. 41–48, 2006.

AMJADI, F. et al. Leptin serves as angiogenic/mitogenic factor in melanoma tumor growth. **Advanced Biomedical Research**, v. 5, n. 1, p. 127, 2016.

ARBISER, J. L. et al. Reactive oxygen generated by Nox1 triggers the angiogenic switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 2, p. 715–720, 2002.

ARNOLD, R. S. et al. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 10, p. 5550–5, 2001.

BAIRATI, I. et al. Randomized trial of antioxidant vitamins to prevent acute adverse effects of radiation therapy in head and neck cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 24, p. 5805–5813, 2005.

BAK, D. W.; WEERAPANA, E. Cysteine-mediated redox signalling in the mitochondria. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 3, p. 678–697, 2015.

BANSKOTA, S.; REGMI, S. C.; KIM, J. A. NOX1 to NOX2 switch deactivates AMPK and induces invasive phenotype in colon cancer cells through overexpression of MMP-7. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 123, 2015.

BAUER, G. Targeting extracellular ROS signaling of tumor cells. **Anticancer Research**, v. 34, n. 4, p. 1467–1482, 2014.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BIELENBERG, D. R.; ZETTER, B. R. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. **Cancer Journal (United States)**, v. 21, n. 4, p. 267–273, 2015.

BIENERT, G. P. et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1183–1192, 2007.

BJELAKOVIC, G. et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 297, n. 8, p. 842–857, 2007.

BOONE, B. et al. EGFR in melanoma: Clinical significance and potential therapeutic

target. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 38, n. 6, p. 492–502, 2011.

BOONSTRA, J.; POST, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v. 337, n. SUPPL., p. 1–13, 2004.

BRANDES, N.; SCHMITT, S.; JAKOB, U. Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 5, p. 997–1014, 2009.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 76, p. 208–226, 2014.

CARLSON, J. A. et al. Molecular diagnostics in melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 5, p. 743–775, 2005.

CASTLE, J. C. et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. **Cancer Research**, v. 72, n. 5, p. 1081–1091, 2012.

CHOTINER, J. Y.; WOLGEMUTH, D. J.; WANG, P. J. Functions of cyclins and CDKs in mammalian gametogenesis†. **Biology of Reproduction**, n. Figure 1, 2019.

CIARLETTA, P.; FORET, L.; AMAR, M. BEN. The radial growth phase of malignant melanoma: Multi-phase modelling, numerical simulations and linear stability analysis. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 8, n. 56, p. 345–368, 2011.

CICHOREK, M. et al. Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013.

COSTA, A.; SCHOLER-DAHIREL, A.; MECHTA-GRIGORIOU, F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 25, n. 2014, p. 23–32, 2014.

CRAIGE, S. M. et al. NADPH Oxidase 4 Promotes Endothelial Angiogenesis Through eNOS Activation. **Circulation**, v. 124, n. 6, p. 731–740, 2011.

CRAIGE, S. M.; KANT, S.; KEANEY, J. F. Reactive Oxygen Species in Endothelial Function: From Disease to Adaptation. **Circulation Journal**, v. 79, n. 6, p. 1145–1155, 2015.

CZYZ, M. HGF/c-MET signaling in melanocytes and melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

DAMSKY, W. E.; ROSENBAUM, L. E.; BOSENBERG, M. Decoding melanoma metastasis. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 126–163, 2011.

DE WIT, P. E. J. et al. Increasing epidermal growth factor receptor expression in human melanocytic tumor progression. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 99, n. 2, p. 168–173, 1992.

DENG, X.; GAO, F.; MAY, W. S. Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3179–3185, 2003.

EBERLE, J.; HOSSINI, A. Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma. **Current Genomics**, v. 9, n. 6, p. 409–419, 2008.

EGEA, J. et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings

and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). **Redox Biology**, v. 13, n. May, p. 94–162, 2017.

ESPOSITO, F. et al. A new p21waf1/cip1 isoform is an early event of cell response to oxidative stress. **Cell Death and Differentiation**, v. 5, p. 940–945, 1998.

FERRARO, D. et al. Pro-metastatic signaling by c-Met through RAC-1 and reactive oxygen species (ROS). **Oncogene**, v. 25, n. 26, p. 3689–3698, 2006.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453–458, 2003.

FISHER, A. B. Redox signaling across cell membranes. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 6, p. 1349–1356, 2009.

FITZGERALD, A. L. et al. Reactive oxygen species and p21Waf1/Cip1 are both essential for p53-mediated senescence of head and neck cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 3, p. e1678-10, 2015.

FUKAI, MASUKO U.; NAKAMURA, Y. Reactive Oxygen Species and Angiogenesis NADPH Oxidase as. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 37–52, 2008.

GAL, K. LE et al. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 308, p. 1–8, 2015.

GALADARI, S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 104, n. January, p. 144–164, 2017.

GAMBHIR, L. et al. Perturbation in cellular redox homeostasis: Decisive regulator of T cell mediated immune responses. **International Immunopharmacology**, v. 67, n. May 2017, p. 449–457, 2019.

GÀO, X.; SCHÖTTKER, B. Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: A systematic review of literature reviews. **Oncotarget**, v. 8, n. 31, p. 51888–51906, 2017.

GARAY, T. et al. Sensitivity of Melanoma Cells to EGFR and FGFR Activation but Not Inhibition is Influenced by Oncogenic BRAF and NRAS Mutations. **Pathology and Oncology Research**, v. 21, n. 4, p. 957–968, 2015.

GARRIDO-URBANI, S. et al. Targeting vascular NADPH oxidase 1 blocks tumor angiogenesis through a PPARα mediated mechanism. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

GAVAZZI, G. et al. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. **FEBS Letters**, v. 580, n. 2, p. 497–504, 2006.

GENKYOTEX. **Preclinical NOX1 program**. Disponível em: <https://www.genkyotex.com/en/news-events/events/14-french-life-sciences-days.html>.

GIMENEZ, M. et al. Nox1 in cardiovascular diseases: Regulation and pathophysiology. **Clinical Science**, v. 130, n. 3, p. 151–165, 2016.

GORDON-THOMSON, C.; MASON, R. S.; MOORE, G. P. M. Regulation of epidermal growth factor receptor expression in human melanocytes. **Experimental Dermatology**, v. 10, n. 5, p. 321–328, 2001.

GRIENDLING, K. K. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. **Heart**, v. 90, n. 5, p. 491–493, 2004.

GROSS, A. et al. Expression and activity of EGFR in human cutaneous melanoma cell lines and influence of vemurafenib on the EGFR pathway. **Targeted Oncology**, v. 10, n. 1, p. 77–84, 2015.

GWANGWA, M. V.; JOUBERT, A. M.; VISAGIE, M. H. Crosstalk between the Warburg effect, redox regulation and autophagy induction in tumourigenesis. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 23, n. 1, p. 1–19, 2018.

HA, L. et al. Animal models of melanoma. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 10, n. 2, p. 86–8, 2005.

HALILOVIC, E.; SOLIT, D. B. Therapeutic strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 419–426, 2008.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179–1180, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and medicine**. Fifth edit ed. Oxford: [s.n.].

HELFINGER, V. et al. The NADPH Oxidase Nox4 mediates tumour angiogenesis. **Acta Physiologica**, v. 216, n. 4, p. 435–446, 2016.

HENGST, L.; REED, S. I. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. **Science**, v. 271, n. 5257, p. 1861–1864, 1996.

IBAÑEZ, I. L. et al. Phosphorylation and Subcellular Localization of p27Kip1 Regulated by Hydrogen Peroxide Modulation in Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 12–15, 2012.

INCA. **Incidência de câncer no Brasil Estimavita/2018**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2018.

JAIN, M. et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-β signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 2, p. 770–777, 2013.

JUHASZ, A. et al. NADPH oxidase 1 supports proliferation of colon cancer cells by modulating reactive oxygen species-dependent signal transduction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 19, p. 7866–7887, 2017.

KHRAMTSOV, V. V.; GILLIES, R. J. Janus-faced tumor microenvironment and redox. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 21, n. 5, p. 723–729, 2014.

KIM, Y. W.; BYZOVA, T. V. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. **Blood**, v. 123, n. 5, p. 625–631, 2014.

KUZU, F. et al. Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research Supplementary Issue: Animal Models of Cancer Biology. **CanCer Growth and Metastasis**, v. 8, n. s1, p. 81–94, 2015.

LAMBETH, J. D.; NEISH, A. S. Nox Enzymes and New Thinking on Reactive Oxygen: A Double-Edged Sword Revisited. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, n. 1, p. 119–145, 2014.

LANDRY, W. D.; COTTER, T. G. ROS signalling, NADPH oxidases and cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 4, p. 934–938, 2014.

LASSEGUE, B.; SAN MARTIN, A.; GRIENDLING, KATHY K, A. Oxidases in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 110, n. 10, p. 1364–1390, 2012.

LAURINDO, F. R. M.; ARAUJO, T. L. S.; ABRAHÃO, T. B. Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 17, p. 2755–2775, 2014.

LEE, M. Y. et al. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) Contribution to Injury-induced Neointimal Formation. v. 29, n. 4, p. 480–487, 2009.

LEWIS, E. M. et al. Phosphorylation of p22phox on threonine 147 enhances NADPH oxidase activity by promoting p47phox binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 5, p. 2959–2967, 2010.

LIU, F.; GOMEZ GARCIA, A. M.; MEYSKENS, F. L. NADPH oxidase 1 overexpression enhances invasion via matrix metalloproteinase-2 and epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 8, p. 2033–2041, 2012.

LIU, Y.; SHEIKH, M. S. Melanoma: Molecular pathogenesis and therapeutic management. **Molecular and Cellular Pharmacology**, v. 6, n. 3, p. 31–44, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LORUSSO, G.; RÜEGG, C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 6, p. 1091–1103, 2008.

LUPUT, L. et al. Tumor-Associated macrophages favor C26 murine colon carcinoma cell proliferation in an oxidative stress-dependent manner. **Oncology Reports**, v. 37, n. 4, p. 2472–2480, 2017.

MA, M. W. et al. NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 1–28, 2017.

MARTI, G. et al. Introduction to flow cytometry. **Seminars in Hematology**, v. 38, n. 2, p. 93–9, 2001.

MCGRATH, S. A. Induction of p21 WAF / CIP1 during Hyperoxia. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 18, n. 2, p. 179–87, 1998.

MEYLE, K. D.; GULDBERG, P. Genetic risk factors for melanoma. **Human Genetics**, v. 126, n. 4, p. 499–510, 2009.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. J. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 2006.

MISHRA, H. et al. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2283–2302, 2018.

MONTE, M.; DAVEL, L. E.; SACERDOTE DE LUSTIG, E. Hydrogen peroxide is

involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. **European Journal of Cancer Part A**, v. 33, n. 4, p. 676–682, 1997.

NAUMOV, G. N. et al. A model of human tumor dormancy: An angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 98, n. 5, p. 316–325, 2006.

NAUSEEF, W. M. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p. 16961–16965, 2008.

OBRADOR, E. et al. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. **Biological Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 589–612, 2019.

OPAS. **Folha informativa**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094>. Acesso em: 22 nov. 2018.

OVERWIJK, W. W.; RESTIFO, N. P. B16 as a melanoma model for human. In: **Curr Protoc Immunol**. Unit-20. ed. [s.l: s.n.]. p. 20.1.

PARASCANDOLO, A.; LAUKKANEN, M. O. Carcinogenesis and reactive oxygen species signaling: Interaction of the NADPH oxidase NOX1-5 and superoxide dismutase 1-3 signal transduction pathways. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 30, n. 3, p. 443–486, 2019.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. **Diabetes care**, v. 31, n. Suppl 2, p. S170–S180, 2008.

PARK, M. T. et al. Novel signaling axis for ROS generation during k-ras-induced cellular transformation. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 8, p. 1185–1197, 2014.

PARVEZ, S. et al. Redox signaling by reactive electrophiles and oxidants. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 18, p. 8798–8888, 2018.

PRASAD, R.; KAPPES, J. C.; KATIYAR, S. K. Inhibition of NADPH oxidase 1 activity and blocking the binding of cytosolic and membrane-bound proteins by honokiol inhibit migratory potential of melanoma cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 7, p. 7899–7912, 2016.

PRIETO-BERMEJO, R.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A. The importance of NADPH oxidases and redox signaling in angiogenesis. **Antioxidants**, v. 6, n. 2, 2017.

RANJAN, P. et al. Redox-dependent expression of cyclin D1 and cell proliferation by Nox1 in mouse lung epithelial cells. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 8, n. 9–10, p. 1447– 59., 2006.

RASTRELLI, M. et al. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. v. 1012, p. 1005–1011, 2014.

ROLAND, C. L. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 7, p. 1761–1771, 2009.

ROUAUD, F. et al. Mechanism of melanoma cells selective apoptosis induced by a photoactive NADPH analogue. **Oncotarget**, v. 7, n. 50, p. 82804–82819, 2016.

RUSSO, T. et al. A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 49, p. 29386–29391, 1995.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, B. **NADPH oxidasas como dianas terapeuticas en la leucemia mieloide crônica (CML)**. [s.l.] Universidad de Salamanca, 2014.

SANCHO, P.; FABREGAT, I. NADPH oxidase NOX1 controls autocrine growth of liver tumor cells through up-regulation of the epidermal growth factor receptor pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 32, p. 24815–24824, 2010.

SARSOUR, E. H. et al. Redox control of the cell cycle in health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 11, n. 12, p. 2985–3011, 2009.

SEO, J. M. et al. Up-regulation of BLT2 is critical for the survival of bladder cancer cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 43, n. 3, p. 129–137, 2011.

SHAKED, Y. The pro-tumorigenic host response to cancer therapies. ***Nat Rev Cancer*** 19, 667–685 (2019) doi:10.1038/s41568-019-0209-6

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, n. January, p. 613–619, 2017.

SPARROW, L. E.; HEENAN, P. J. Differential expression of epidermal growth factor receptor in melanocytic tumours demonstrated by immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 40, n. 1, p. 19–24, 1999.

STALIN, J. et al. Inhibition of host NOX1 blocks tumor growth and enhances checkpoint inhibitor–based immunotherapy. **Life Science Alliance**, v. 2, n. 4, p. e201800265, 2019.

STANIC, B.; KATSUYAMA, M.; MILLER, F. J. An Oxidized Extracellular Redox State Increases Nox1 Expression and Proliferation in Vascular Smooth Muscle Cells via EGFR Activation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 30, n. 11, p. 2234–2241, 2010.

SUH, Y. et al. Celltransformationbythesuperoxide- generating oxidase Mox1. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 79–82, 1999.

TEIXEIRA, G. et al. Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1647–1669, 2017.

THORÉN, F. B. et al. Cutting Edge: Antioxidative Properties of Myeloid Dendritic Cells: Protection of T Cells and NK Cells from Oxygen Radical-Induced Inactivation and Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 21–25, 2007.

TIRONE, F. et al. Identification of the binding site for the regulatory calcium-binding domain in the catalytic domain of NOX5. **Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 761–771, 2010.

TOJO, T. et al. Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. **Circulation**, v. 111, n. 18, p. 2347–2355, 2005.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-

mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 7, p. 579–591, 2009.

UGUREL, S. et al. B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. **PLoS ONE**, v. 2, n. 2, 2007.

USHIO-FUKAI, M. Redox signaling in angiogenesis: Role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 2, p. 226–235, 2006.

USHIO-FUKAI, M.; ALEXANDER, R. W. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling. Role of NAD(P)H oxidase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 264, n. 1–2, p. 85–97, 2004.

VAN DAM, P. A. et al. Comparative evaluation of fresh, fixed, and cryopreserved solid tumor cells for reliable flow cytometry of DNA and tumor associated antigen. **Cytometry**, v. 13, n. 7, p. 722–729, 1992.

VENKATACHALAM, P. et al. Regulation of normal cell cycle progression by flavin-containing oxidases. **Oncogene**, v. 27, n. 1, p. 20–31, 2008.

VENZA, M. et al. Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Action in Melanoma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

VERBON, E. H.; POST, J. A.; BOONSTRA, J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v. 511, n. 1, p. 1–6, 2012.

WAGNER, E. F.; NEBREDA, Á. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 8, p. 537–549, 2009.

WANG, X.; SUN, Z. Thyroid hormone induces artery smooth muscle cell proliferation: Discovery of a new TRα1-Nox1 pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 1–2, p. 368–380, 2010.

WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Med**, v. 324, n. 1, p. 1–8, 1991.

WEINBERG, F.; RAMNATH, N.; NAGRATH, D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 8, 2019.

WEYEMI, U. et al. NADPH Oxidases NOXs and DUOXs as Putative Targets for Cancer Therapy. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 3, p. 502– 514., 2013.

WHEELER, M. D.; SMUTNEY, O. M.; JUDE SAMULSKI, R. Secretion of Extracellular Superoxide Dismutase From Muscle Transduced With Recombinant Adenovirus Inhibits the Growth of B16 Melanomas in Mice. **Molecular Cancer Research**, v. 1, n. 12, p. 871–881, 2003.

WIESEL, P. et al. **Safety and pharmacokinetics of single and multiple doses of a first in class dual NADPH oxidase 1 and 4 inhibitor administered orally in healthy**. American Society of Nephrology Kidney Week. **Anais**...San Diego: 2012

WILKINSON-BERKA, J. L. et al. Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: Implications for retinopathy. **Clinical Science**, v. 124, n. 10, p. 597–615, 2013.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278–286, 2008.

WINTERBOURN, C. C. Biological Chemistry of Reactive Oxygen Species. Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials. 2012

XU, Q. et al. NADPH oxidases are essential for macrophage differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 38, p. 20030–20041, 2016.

YAMAMOTO, T. et al. Identification and characterization of a novel NADPH oxidase 1 (Nox1) inhibitor that suppresses proliferation of colon and stomach cancer cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 3, p. 419–426, 2018.

ZAKERI, Z. et al. Cell Death in Mammalian Development. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 2, p. 184–196, 2008.

ZHANG, Q. et al. The novel protective role of P27 in MLN4924-treated gastric cancer cells. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 8, p. 1–12, 2015.

ZHANG, Y. et al. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages. **Cell Research**, v. 23, n. 7, p. 898–914, 2013.

ZHIYA, Y. et al. MOUSE MODEL FOR PRE-CLINICAL STUDY OF HUMAN CANCER IMMUNOTHERAPY. **Curr Protoc Immunol**, v. 108, p. 20.1.1–20.1.43., 2015.

ZHUANG, J. et al. NADPH oxidase 4 mediates reactive oxygen species induction of CD146 dimerization in VEGF signal transduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 2, p. 227–236, 2010.

ZOHNY, S. F. et al. p21 Waf1/Cip1 : its paradoxical effect in the regulation of breast cancer. **Breast Cancer**, v. 26, n. 2, p. 131–137, 2019.