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

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.

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).

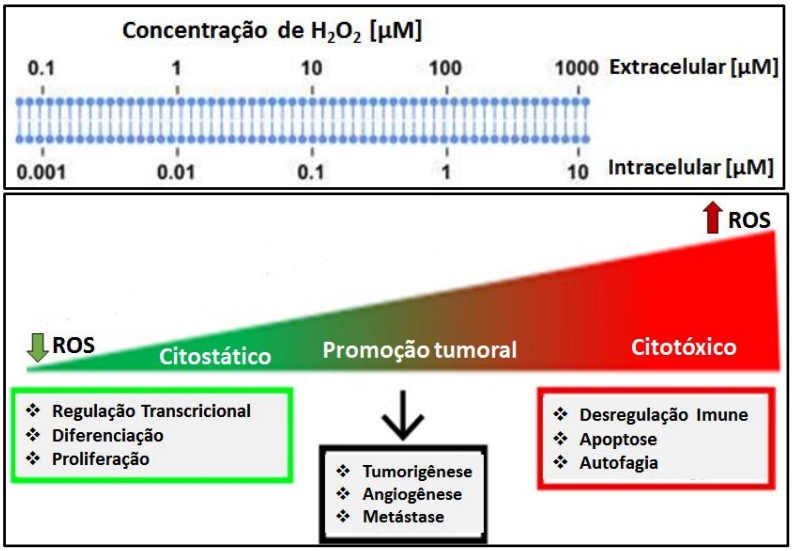

Figura 1. Concentração de ROS e seus efeitos correspondentes na função biológica. Adaptado (SIES, 2017; WEINBERG; RAMNATH; NAGRATH, 2019).

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).

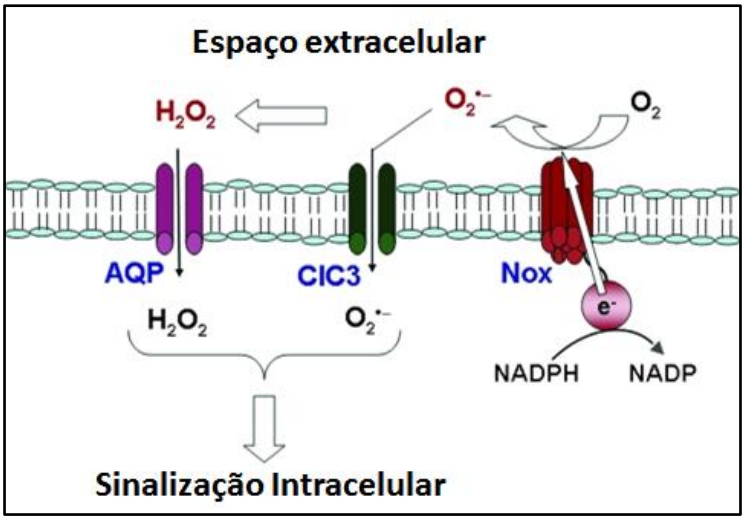

Figura 2. Geração de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase ativada (Nox). Adaptado (FISHER, 2009).

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).

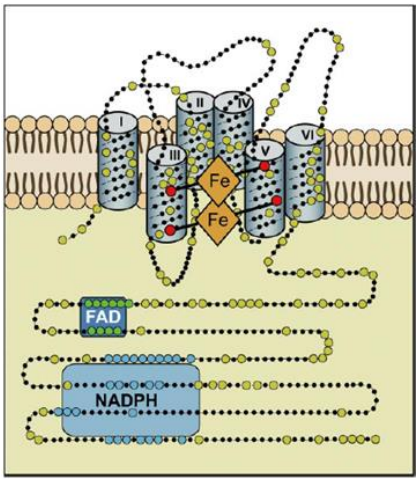

Figura 3. Estrutura do centro catalítico da família NADPH oxidase (BEDARD; KRAUSE, 2007).

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).

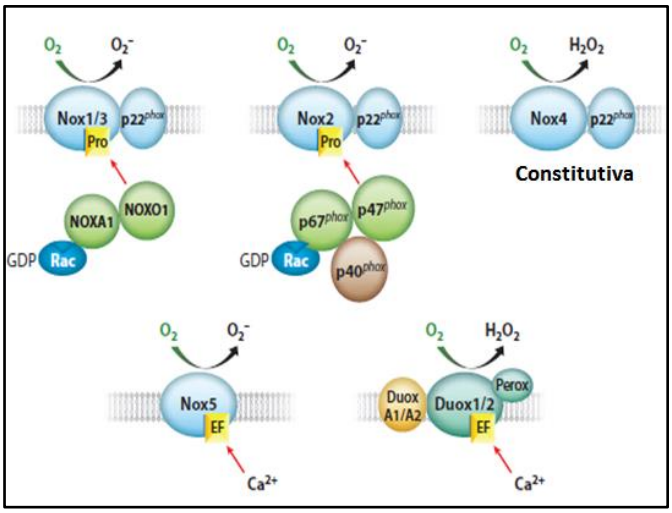

Figura 4. Representação esquemática da Família da NADPH oxidase. Adaptado (LAMBETH; NEISH, 2014).

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).

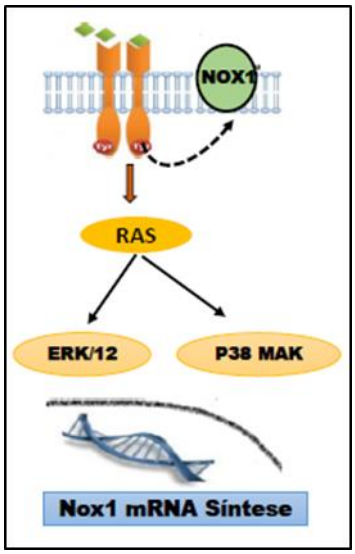

Figura 5. Estimulação da expressão de Nox1. A ativação da Nox1 por fatores de crescimento induz a via RAS-ERK1/2 e vias de sinalização RAS-p38MAPK, que estimulará a síntese de mRNA de Nox1 Adaptado de (PARASCANDOLO; LAUKKANEN, 2019).

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).

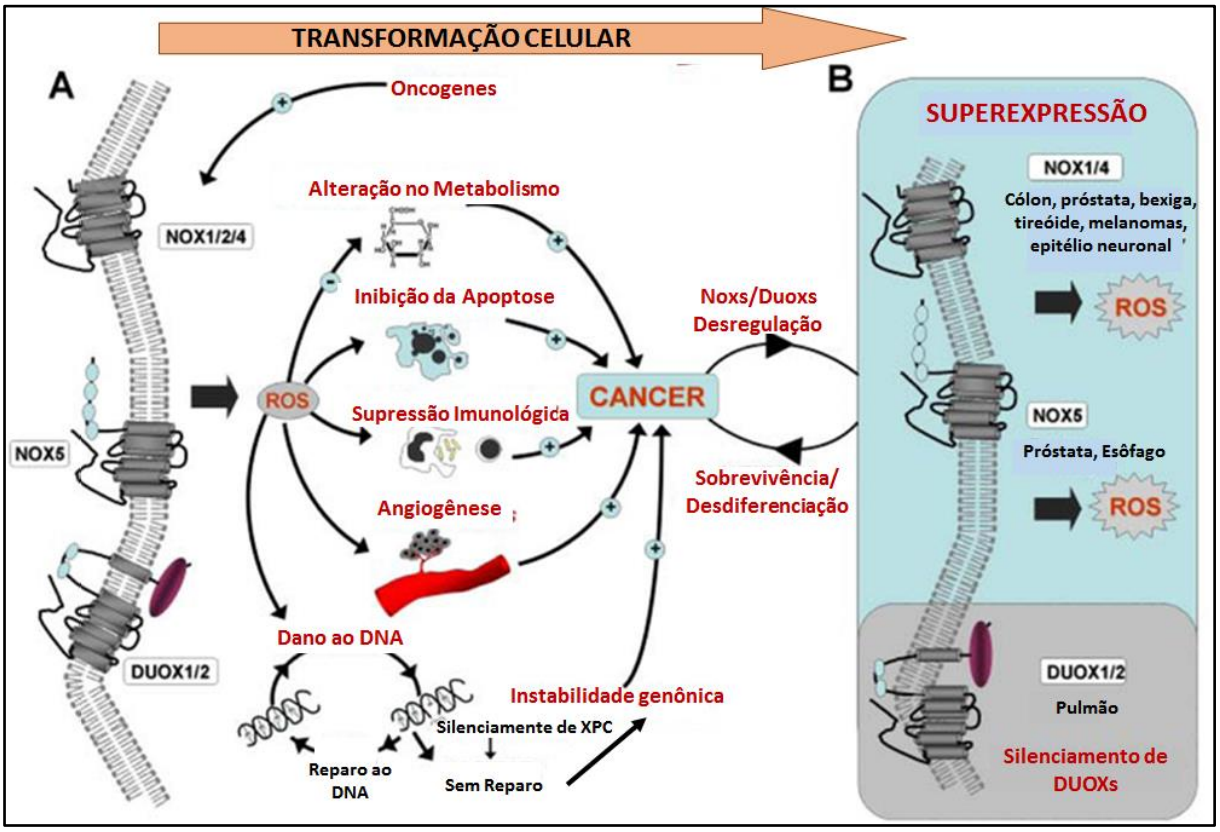

Figura 6. Modelo para o papel das NADPH oxidases no desenvolvimento do câncer. **A**, Oncogenes ativam constitutivamente as NADPH oxidases que resulta em produção acumulada das ROS e na formação de danos no DNA e aberrações cromossômicas, levando à instabilidade genômica e transformação celular. ROS 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).

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.