

Júlia Cisilotto

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E  
ANTIMETASTÁTICOS DE SAIS DE ISOTIOURÔNIO, DE N-  
FENILISOTIOURÔNIO E DE ISOTIOSSEMICARBAZIDAS EM  
LINHAGENS DE MELANOMA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cisilotto, Júlia

Avaliação *in vitro* dos efeitos citotóxicos e antimetastáticos de sais de isotiourônio, de *N*-fenilisotiourônio e de isotiossemicarbazidas em linhagens de melanoma/Júlia Cisilotto; orientadora, Tânia Beatriz Creczynski-Pasa - Florianópolis, SC, 2014.

120 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. farmácia. 2. melanoma. 3. sais de isotiourônio. 4. citotoxicidade. 5. expressão de N-RAS e B-RAF. I. Creczynski-Pasa, Tânia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Júlia Cisilotto

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E  
ANTIMETASTÁTICOS DE SAIS DE ISOTIOURÔNIO, DE N-  
FENILISOTIOURÔNIO E DE ISOTIOSSEMICARBAZIDAS EM  
LINHAGENS DE MELANOMA**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Farmácia, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Farmácia, área de concentração de Fármaco-Medicamento.

Florianópolis, 14 de março de 2014.

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Farmácia

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda Bueno Morrone  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudriana Locatelli  
Universidade do Oeste de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maique Weber Biavatti  
Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a oportunidade de viver a vida da forma como ela é e por tudo o que ela me proporciona.

À Prof.<sup>a</sup> Tânia Beatriz Creczynski Pasa, agradeço muito a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Obrigada por me receber de braços abertos e por acreditar em mim mesmo não me conhecendo. Obrigada pelo acolhimento, confiança, amizade e também por compartilhar seu amplo conhecimento com todos do laboratório.

À Prof.<sup>a</sup> Fabíola Filippin Monteiro, agradeço pela troca de conhecimentos, pela amizade, por sempre disponibilizar um tempo para ajudar todos e também por ser exemplo de uma pessoa que ama a profissão.

Agradeço a minha família por todos os ensinamentos, dedicação, afeto, incentivo e apoio em todos esses anos.

Agradeço ao Éverton pelos momentos que passamos juntos, pelo amor, amizade, paciência, compreensão e por sempre tentar me deixar alegre.

A todos os colegas do laboratório, muito obrigada pela ajuda, troca de conhecimentos e experiências e pela belíssima amizade que construímos.

Ao prof. Marcus Mandolesi Sá e seu aluno Misael Ferreira, agradeço pela colaboração e pelo fornecimento dos compostos químicos utilizados neste estudo.

Aos membros da banca examinadora, meus agradecimentos pela contribuição e disponibilidade de avaliar meu trabalho.

Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Incluo, de forma especial, todos os meus amigos, que de uma forma ou de outra deixaram meus dias mais felizes e também contribuíram para a realização deste trabalho. Expresso a minha gratidão a todos.

Este trabalho não poderia ser concluído sem ajuda de todos vocês.



Feliz aquele que transfere o que sabe  
e aprende o que ensina.

Cora Coralina (1889-1985)





## RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele extremamente agressivo, devido à alta propensão em produzir metástases. As mutações do tipo B-RAF e N-RAS são frequentemente encontradas em pacientes com essa doença. Por isso, a busca por novas moléculas que inibam essas proteínas tem se intensificado nos últimos tempos. Após muitos anos sem aprovação de um novo medicamento para o melanoma metastático, em 2011 o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o vemurafenibe (inibidor da B-RAF<sup>V600E</sup>). Porém, muitos pacientes já adquiriram resistência a esse fármaco e manifestaram efeitos colaterais relevantes. Embora a detecção precoce resulte em aumento das taxas de cura, o prognóstico do melanoma metastático é desfavorável para os pacientes. Em trabalho anterior do nosso grupo sais de isotiourônio apresentaram uma importante seletividade para ação antitumoral. Neste sentido, este trabalho tem o objetivo de avaliar *in vitro* a atividade citotóxica e antimetastática dos sais de isotiourônio (MF01, MF02 e MF03), sal de *N*-fenilisotiourônio (MF12) e sais de isotiossemicarbazidas (MF14 e MF15) em linhagens de melanoma (B16-F-10, SK-MEL-19, SK-MEL-28 e SK-MEL-147) com diferentes mutações. Os sais de isotiourônio apresentaram as CC<sub>50</sub> (concentração do composto que causa 50% de morte celular) mais baixas, entre 7 a 28 µM para as linhagens tumorais. Os outros sais não mostraram atividade relevante. Quando a citotoxicidade foi comparada com uma célula não tumoral, os sais demonstraram ser mais seletivos para as células tumorais. Baseado nestes resultados avaliou-se a expressão dos genes N-RAS e B-RAF, que se encontram frequentemente mutados no melanoma. Os compostos MF02 e MF03 aumentaram a expressão de B-RAF. Já o sal MF01 diminuiu significativamente a expressão de N-RAS. A incubação dos sais com as linhagens de melanoma não alterou a progressão do ciclo celular, entretanto foi observado um aumento de células em apoptose quando tratadas com os compostos, principalmente com o MF01. Além disso, constatou-se que os compostos MF01 e MF02 diminuíram significativamente a migração e a invasão celular. Ainda, o vemurafenibe (PLX4032) foi associado aos sais MF01, MF02 e MF03. Esta associação resultou em citotoxicidade mais acentuada quando comparada com os compostos isolados. Diante dos resultados, ressalta-se que os sais de isotiourônio demonstraram os melhores resultados, especialmente o MF01 que diminuiu a expressão de N-RAS, aumentou o número de células apoptóticas, diminuiu a proliferação, migração e invasão celular e, além disso, quando associado ao PLX4032, resultou em efeito sinérgico.

**Palavras-chave:** sais de isotiourônio, melanoma, citotoxicidade, expressão de N-RAS e B-RAF, atividade antimetastática, vemurafenibe.



## ABSTRACT

Melanoma is a very aggressive type of skin cancer due to an intrinsic high propensity to metastasize. Mutation in B-RAF and N-RAS are often found in patients with this disease. Therefore, the search for new molecules that inhibit these proteins has been intensified recently. In 2011, after many years with no new drug approval for metastatic melanoma, the FDA (Food and Drug Administration) has approved the vemurafenib (inhibitor of B-RAF<sup>V600E</sup>). However, many patients have already acquired resistance to this drug and showed severe side effects. Although early detection results in higher cure rates, the prognosis of metastatic melanoma is very unfavorable. In a recent work of our group it was found a selective antitumoral action for isothiuronium salts. For this reason, this work aims to evaluate *in vitro* the cytotoxic and antimetastatic activities of isothiuronium salts (MF01, MF02 and MF03), *N*- phenylisothiuronium (MF12) e isothiosemicarbazides salts (MF14 e MF15) in different melanoma cell lines (B16-F10, SK-MEL-19, SK-MEL-28 e SK-MEL-147) with different mutations. The isothiuronium salts presented lowest CC<sub>50</sub>s (concentration of compound that causes 50 % of cell death) ranging between 7 - 28  $\mu$ M for tumoral cell lines. The other salts, however, did not show significant activity. When the cytotoxicity was compared to a non-tumoral cell, salts presented high selectivity towards tumoral cells. Next, gene expression of N-RAS and B-RAF was also evaluated. MF02 and MF03 compounds induced a increased expression of B-RAF, since the MF01 salt significantly decreased the expression of N-RAS. Melanoma cells incubated with the salts did not alter the cell cycle phases, however, it was observed an increase in the amount of apoptotic cells, especially with MF01. Besides that, it was observed that MF01 and MF02 significantly decrease cell migration and cell invasion. Finally, MF01, MF02 and MF03 salts were associated with vemurafenib (PLX4032). These combinations resulted in a marked decrease in cell viability when compared to the compounds alone. Considering the results, the isothiuronium salts demonstrated interesting results, specially MF01 which decreased the expression of N-RAS, increased the number of apoptotic cells, decreased cell proliferation, migration and invasion. Moreover, when combined with PLX4032 resulted in a synergistic effect.

**Keywords:** isothiuronium salts. melanoma. cytotoxicity. expression of N-RAS and B-RAF. antimetastatic activity. vemurafenib.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Camadas da pele. A pele é constituída por duas camadas: a epiderme e a derme. A epiderme é a mais externa e a derme é a camada mais profunda. Na epiderme há presença de células escamosas, células basais e também de células especializadas em produzir melanina (melanócitos). .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 2. Características das manchas de melanoma maligno .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 3. Indivíduo com nevos atípicos .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4. Via central das MAPK.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 5. Tratamentos aprovados pelo FDA para o melanoma metastático.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6. Representação esquemática das vias que levam à apoptose.</b>	<b>41</b>
<b>Figura 7. Via do fator de transcrição NF-<math>\kappa</math>B. ....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 8. Montagem experimental do ensaio de invasão celular.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 9. Efeito dos sais MF01, MF02 e MF03 na expressão dos genes N-RAS e B-RAF por PCR quantitativo. ....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 10. Avaliação da morte celular por apoptose induzida pelos sais na linhagem SK-MEL-147. ....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 11. Quantificação do tipo de morte celular induzida pelos sais na linhagem SK-MEL-147. ....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 12. Efeito dos sais sobre a fragmentação de DNA e distribuição das células no ciclo celular na linhagem SK-MEL-147. ....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 13. Avaliação morfológica das células (SK-MEL-147) após incubação por 24 h com os compostos. As fotos foram tiradas no aumento de 200 e 400x em microscópio de luz. ....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 14. Efeito dos sais sobre a fragmentação de DNA e distribuição das células no ciclo celular na linhagem SK-MEL-28. ....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 15. Migração celular, ensaio de fechamento de fenda em monocamada. ....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 16. Migração celular, ensaio de fechamento de fenda em monocamada. ....</b>	<b>83</b>

<b>Figura 17. Efeito dos sais sobre o ensaio de Invasão Celular.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 18. Avaliação da viabilidade celular durante 72 h de incubação com os sais (MF01, MF02 e MF03) e com vemurafenibe (PLX4032)...</b>	<b>87</b>
<b>Figura 19. Efeito da combinação dos compostos MF01 (A), MF02 (B), MF03 (C) e PLX4032 na viabilidade das células SK-MEL-28.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 20. Efeito da combinação dos compostos MF01 (A), MF02 (B), MF03 (C) e PLX4032 na viabilidade das células SK-MEL-147.....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 21. Avaliação do Índice Combinatório (IC) do sal MF01 com o composto PLX4032. ....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1 - Lista de reagentes.....</b>	<b>51</b>
<b>Quadro 2 - Estrutura química e características dos compostos .....</b>	<b>55</b>
<b>Quadro 3 - Características das linhagens celulares utilizadas.....</b>	<b>56</b>
<b>Quadro 4 - Iniciadores utilizados na reação de PCR quantitativo (qPCR).....</b>	<b>60</b>
<b>Quadro 5 - Valores do Índice Combinatório (IC) e descrição .....</b>	<b>64</b>





## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 - Concentração do composto que causa 50% de morte celular (CC<sub>50</sub>) definida pelo método de MTT durante 24 h de tratamento com os compostos..... 67**

**Tabela 2 - Índice de Seletividade (IS) definido por meio da razão entre a CC<sub>50</sub> da linhagem não tumoral e a CC<sub>50</sub> da linhagem tumoral ..... 69**



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
APAF-1	Fator ativador de proteases-1
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
B-RAF	Homólogo B do oncogene viral de sarcoma de murino v-raf
BSA	Albumina Sérica Bovina
CC <sub>50</sub>	Concentração do composto que causa 50% de morte celular
cDNA	DNA complementar
Ct	Cycle Threshold (limiar de fase exponencial)
DMEM	Dulbelco's Modified Eagle (meio de cultivo celular)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidermal
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
Hepes	ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)1-piperazinil]-etanosulfônico
IC	Índice Combinatório
IP	iodeto de propídio
IS	Índice de Seletividade
KCl	cloreto de potássio
MM	Melanoma Metastático
MMP	Metaloproteinase
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de sódio monobásico
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sódio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear Kappa B

N-RAS	Homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma (v-ras)
PBS	Tampão Fosfato Salino
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
Pten	Proteína fosfatase e homólogo de angiotensina
PM	Peso Molecular
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SFB	Soro Fetal Bovino
UV	Ultravioleta
WT	<i>Wild Type</i> (selvagem)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>25</b>
2.1 CÂNCER DE PELE .....	25
2.2 MELANOMA MALIGNO .....	26
2.3 VIA DAS MAPK (PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR MITÓGENO).....	31
2.4 ALVO EM RAS.....	32
2.5 ALVO EM B-RAF.....	34
2.6 OUTROS ALVOS.....	36
2.7 APOPTOSE E MELANOMA .....	39
2.8 CICLO CELULAR E MELANOMA .....	44
2.9 METÁSTASE E MELANOMA .....	45
2.10 NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O TRATAMENTO DO MELANOMA .....	47
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>4. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
4.1 REAGENTES.....	51
4.2 SAIS DE ISOTIOURÔNIO, SAL DE N-FENILISOTIOURÔNIO E SAIS DE ISOTIOSSEMICARBAZIDA .....	53
4.3.1 <i>Linhagens Celulares</i> .....	56
4.3.2 <i>Cultivo celular: condições e manutenção</i> .....	57
4.4 VIABILIDADE CELULAR.....	57
4.5 ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	58
4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE N-RAS E B-RAF.....	58
4.6.1 <i>Extração de RNA</i> .....	58
4.6.2 <i>Síntese de cDNA</i> .....	59
4.6.3 <i>RT-PCR</i> .....	59
4.6.4 <i>Curvas de eficiência da reação de PCR</i> .....	59
4.6.5 <i>Reação em cadeia da polimerase (qPCR)</i> .....	60
4.7 AVALIAÇÃO DA MORTE POR APOPTOSE.....	61
4.8 ANÁLISE DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA .....	61

4.9 FOTOMICROGRAFIA DAS CÉLULAS – AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E CITOTOXICIDADE .....	62
4.10 MIGRAÇÃO CELULAR – ENSAIO DE FECHAMENTO DE FENDA EM MONOCAMADA.....	62
4.11 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR .....	62
4.12 ÍNDICE COMBINATÓRIO .....	63
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE A. GEL DE AGAROSE CONTENDO SYBR SAFE® PARA VERIFICAR A MELHOR TEMPERATURA DE ANELAMENTO POR MEIO DA TÉCNICA DE PCR CONVENCIONAL. ....</b>	<b>115</b>
<b>APÊNDICE B. GRÁFICOS DAS CURVAS DE EFICIÊNCIA DOS INICIADORES. ....</b>	<b>116</b>
<b>APÊNDICE C. EFICIÊNCIA DOS INICIADORES.....</b>	<b>117</b>
<b>APÊNDICE D. HISTOGRAMA DO ENSAIO DE CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA DA LINHAGEM SK-MEL-147.....</b>	<b>118</b>
<b>APÊNDICE E. HISTOGRAMA DO ENSAIO DE CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA DA LINHAGEM SK-MEL-28.....</b>	<b>119</b>
<b>APÊNDICE F. VIABILIDADE DAS CÉLULAS SK-MEL-28 APÓS 48 H DE INCUBAÇÃO COM OS SAIS MF01 E MF02.....</b>	<b>120</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é o termo usado para designar malignidade celular, cuja característica principal é o crescimento celular descontrolado. Existem diferentes tipos de câncer e todos apresentam alterações no mecanismo de morte celular que leva à formação de células tumorais. A divisão constante dessas células possibilita a invasão para outros tecidos e órgãos. Isso caracteriza o processo de metástase, que é a principal causa de morte por câncer (SUDHAKAR, 2009).

O câncer já é considerado um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento, sendo que nestes últimos são diagnosticados 55% dos 10 milhões de novos casos anuais. Uma a cada quatro mortes nos Estados Unidos da América é devido ao câncer (SIEGEL, NAISHADHAM e JEMAL, 2013). Essa doença também é responsável por mais de 7,6 milhões de óbitos ao ano. Estimativas sugerem que a mortalidade por câncer continue aumentando. Deverá chegar a aproximadamente 13,1 milhões em 2030 (WHO, 2013).

No Brasil, o investimento do Ministério da Saúde na assistência aos pacientes com câncer foi de 2,1 bilhões de reais, no ano de 2012, 26% a mais em relação a 2010. Até 2014, a previsão é que o valor alocado no fortalecimento do atendimento em oncologia chegue a 4,5 bilhões de reais (INCA, 2014b).

O melanoma é um tipo de câncer que surge a partir dos melanócitos, que são células produtoras de melanina, encontradas predominantemente na pele. O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele. Em estágios mais avançados, a doença é inevitavelmente resistente aos agentes terapêuticos convencionais (GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007).

Entre as vias moleculares envolvidas na patogênese do melanoma, destaca-se a via das MAPK, incluindo a cascata de proteínas RAS, RAF, MEK1/2, ERK1/2. Essa via é apontada como a principal cascata de sinalização envolvida com proliferação, crescimento, migração e sobrevivência celular. E também tem sido relacionada com o desenvolvimento e progressão do melanoma (WELLBROCK e HURLSTONE, 2010).

Mutações em B-RAF e N-RAS são detectadas com muita frequência em pacientes com melanoma (DAVIES *et al.*, 2002). Devido a esses fatores, a busca por novos alvos que interfiram na ação dessas proteínas

foi intensificada nos últimos anos. Em 2011, a agência Food and Drug Administration (FDA) aprovou dois medicamentos para o tratamento do melanoma metastático. O anticorpo monoclonal, ipilimumabe e o inibidor da B-RAF, vemurafenibe (VU e APLIN, 2012). No entanto, esses medicamentos possuem uso limitado na clínica e muitos pacientes desenvolvem efeitos adversos graves (CHAPMAN *et al.*, 2011).

O melanoma pode ser curado completamente com cirurgia, se detectado nos estágios iniciais. Porém, os pacientes com melanoma metastático têm apresentado um prognóstico ruim, sendo que menos de 5% dos acometidos sobrevivem cinco anos (GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007).

Dessa forma, considerando que o melanoma metastático é resistente aos tratamentos atuais, sendo necessário o estudo de novos agentes terapêuticos, e que os sais de isotiourônio, sal de *N*-fenilisotiourônio e sais de isotiossemicarbazidas podem apresentar algum efeito terapêutico, observados em estudo anterior do nosso grupo, o presente estudo visa avaliar os efeitos desses compostos em linhagens celulares de melanoma, buscando contribuir para um maior conhecimento sobre a sua ação citotóxica, além de proporcionar novas possibilidades na terapêutica contra essa doença.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

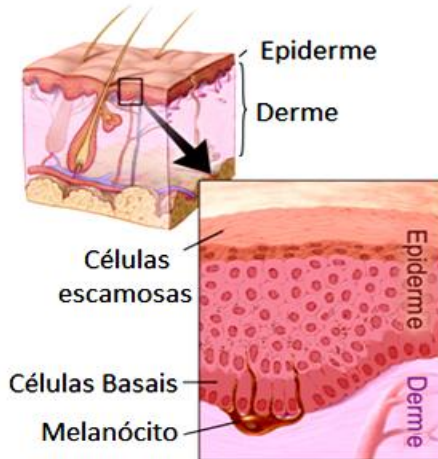
### 2.1 CÂNCER DE PELE

O câncer de pele, ou carcinoma cutâneo, é um problema mundial de saúde pública, cuja incidência tem aumentado nas últimas décadas (GORDON, 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), de dois a três milhões de casos de câncer de pele não melanoma e aproximadamente 132.000 casos de melanoma ocorrem mundialmente a cada ano (WHO, 2013). No Brasil, para o ano de 2014, são esperados 98.420 casos novos de câncer de pele não melanoma nos homens e 83.710 nas mulheres e para o câncer de pele do tipo melanoma estima-se 2.960 casos novos em homens e 2.930 em mulheres (INCA, 2014a).

Os três tipos de cânceres de pele mais conhecidos são: carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular (conhecidos como câncer de pele do tipo não melanoma) e melanoma maligno (MM) (GREINERT, 2009; GORDON, 2013).

O carcinoma basocelular é uma neoplasia maligna derivada das células basais (Figura 1). Uma das características desse tipo de câncer é a presença de pápulas com bordas peroladas, que podem aumentar lentamente com os anos. A metástase é rara, mas o crescimento local pode causar sérios danos à pele (MADAN, LEAR e SZEIMIES, 2010). O carcinoma de células escamosas é um tumor maligno com origem nos queratinócitos (células escamosas) da epiderme (Figura 1). Esse tipo de câncer tem forte associação com a exposição excessiva ao sol e o desenvolvimento de metástases ocorre com mais frequência (MADAN, LEAR e SZEIMIES, 2010). A maioria dos cânceres de pele não melanoma são curáveis, principalmente se detectados nos estágios iniciais (GORDON, 2013). O melanoma é a forma mais letal dos cânceres de pele e sua incidência tem aumentado nas últimas décadas (DESMOND e SOONG, 2003).

**Figura 1. Camadas da pele. A pele é constituída por duas camadas: a epiderme e a derme. A epiderme é a mais externa e a derme é a camada mais profunda. Na epiderme há presença de células escamosas, células basais e também de células especializadas em produzir melanina (melanócitos).**



Adaptado de: The National Cancer Institute, (2014)

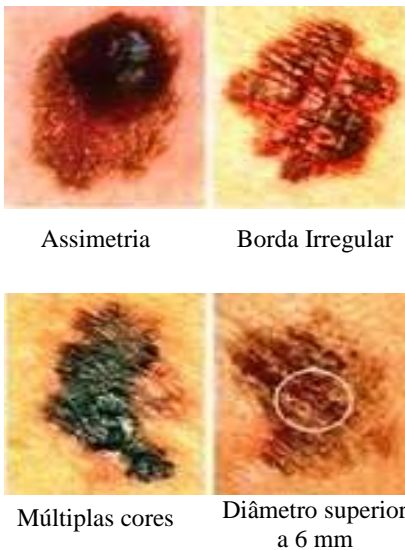
## 2.2 MELANOMA MALIGNO

Os melanócitos são células produtoras de melanina que é responsável pela cor da pele, dos cabelos e dos olhos. Na pele, residem na camada basal da epiderme (Figura 1) e nos folículos capilares e a homeostase é regulada pelos queratinócitos (GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007). O equilíbrio entre melanócitos e queratinócitos é mantido por meio da regulada indução de divisão dos melanócitos. Uma desregulação dessa homeostase pode perturbar o equilíbrio da unidade de melanina na epiderme e desencadear uma proliferação contínua de melanócitos (HAASS, SMALLEY e HERLYN, 2004). Essa proliferação pode levar à formação de nevos ou manchas comuns. Os nevos são geralmente benignos, mas podem evoluir para uma fase de crescimento radial, uma lesão intraepidérmica que pode

envolver alguns locais de microinvasão na derme. As células nessa fase podem ainda avançar para uma fase de crescimento vertical, podendo invadir a derme, transformando-se em melanoma metastático. Dessa forma, os melanócitos são as células que dão origem ao melanoma. Nem todos os melanomas passam por essas fases de crescimento, radial ou vertical. O melanoma pode também desenvolver-se diretamente, a partir dos melanócitos isolados ou nevos, e assim podem progredir diretamente para o melanoma maligno (MILLER e MIHM, 2006; GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007).

A maioria dos casos dessa doença enquadra-se em quatro tipos, de acordo com a localização anatômica do tumor primário e características histopatológicas da lesão. O **melanoma de crescimento superficial** é o tipo mais frequente, pode ocorrer em qualquer idade e em qualquer parte do corpo. As lesões clássicas mostram variação na pigmentação e disseminação pagetoide. O **melanoma nodular** é o segundo tipo mais comum. Trata-se de uma forma agressiva, geralmente origina-se na pele íntegra e não possui uma fase de crescimento radial prévio. O **melanoma lentigo maligno** surge principalmente em idade avançada e em zonas com exposição solar crônica. Contudo, o **melanoma lentiginoso acral** é o mais raro, aparece com mais frequência em japoneses e em pessoas com pele escura e localiza-se essencialmente nas extremidades do corpo (BANDARCHI *et al.*, 2010; WHITEMAN, PAVAN e BASTIAN, 2011).

O melanoma pode ocorrer em todos os tecidos e órgãos que contêm melanócitos, tais como: epiderme, mucosa oral, olhos, epitélio da cavidade nasal, orofaringe, anus, trato-urinário, entre outros (CHANG, KARNELL e MENCK, 1998; WHITEMAN, PAVAN e BASTIAN, 2011). No entanto, a maioria dos casos de melanoma ocorre na superfície da pele. São, portanto, de detecção mais fácil (CUMMINS *et al.*, 2006). Algumas características atípicas nas manchas da pele podem ser sugestivas de melanoma maligno. Entre essas, observa-se na Figura 2 a assimetria da lesão, as bordas irregulares, a coloração variada (principalmente preto, vermelho, azul e branco) e, na maioria dos casos, o diâmetro da mancha superior a 6 mm (CHAIDEMENOS *et al.* 2008).

**Figura 2. Características das manchas de melanoma maligno**

Fonte: Skin Cancer Foundation, (2014)

A biópsia excisional ainda é o padrão ouro para diagnóstico do melanoma. Consiste na determinação da extensão da doença, sendo importante para planejar o tratamento mais adequado (GARBE *et al.*, 2008). Para o melanoma cutâneo primário, sem evidência de metástase, a cirurgia é o tratamento de escolha, sendo que a excisão da lesão é curativa para a maioria dos pacientes. A radioterapia somente é utilizada em alguns casos, como um elevado risco de metástases e recorrência local. Para o melanoma metastático, a cirurgia raramente é curativa. Nesse caso outras estratégias são adotadas para o tratamento, como quimioterapia e imunoterapia, mas na maioria dos casos são de difícil cura (WAINSTEIN e BELFORT, 2004).

Durante as últimas décadas, o número de novos casos de melanoma tem aumentado rapidamente em todo o mundo. Com o aumento da população idosa, a incidência aumentou de 4% a 6% ao ano, principalmente nas populações de pele mais clara. O melanoma representa 4% dos cânceres de pele, mas é responsável por 80% dos casos de mortes provocadas por esta doença (MILLER e MIHM, 2006;

ARNOLD *et al.*, 2013). No estudo de Arnold *et al.* (2013), analisando registros de 20 países da Europa, percebeu-se que a incidência de melanoma é maior em mulheres do que em homens, com exceção da República Checa, Finlândia e Eslováquia. Nesse estudo, foi observado que a incidência de melanoma continuará subindo e será mais incidente em mulheres, na maioria dos países europeus. As maiores taxas de incidência foram observadas no Reino Unido, na Irlanda e Holanda e as menores taxas, na Espanha e em Portugal. Um número maior de casos foi detectado em idosos (mais de 70 anos), enquanto que os índices na população mais jovem (25 a 49 anos) se mantiveram mais estáveis (ARNOLD *et al.*, 2013). Em outro estudo, foi observado que Auckland, na Nova Zelândia, tem a mais alta incidência de melanoma metastático do mundo, com uma taxa anual de 77,7 por 100.000 habitantes. Esse elevado índice foi relacionado com a proteção inadequada ao sol. Mas espera-se que com educação pública e conscientização da população as taxas diminuam em longo prazo (JONES *et al.*, 1999).

Muitos fatores de risco têm demonstrado influenciar no desenvolvimento do MM. A exposição à radiação ultravioleta (UV) está muito relacionada com o desenvolvimento do MM. Queimaduras solares frequentes, principalmente na infância, têm demonstrado aumento do risco de MM (ZANETTI *et al.*, 1992). Essa exposição ao sol sobre a pele pode resultar em efeitos mutagênicos (RUSSAK e RIGEL, 2012). Como exemplo disso, cita-se o gene supressor p53, que em alguns casos encontra-se mutado em melanoma e é muito afetado pela exposição à radiação UV. Com esse gene alterado, podem ocorrer alterações no ciclo celular, nos processos de morte por apoptose, e o reparo do DNA pode ser afetado (OUHTIT *et al.*, 1998). A radiação solar pode causar danos às moléculas e células, incluindo proteínas, lipídeos e DNA, que resultam em imunossupressão, fotoenvelhecimento e até em câncer propriamente dito (RUSSAK e RIGEL, 2012).

Outro fator de risco importante para o desenvolvimento de MM é a presença de nevos melanocíticos, com aparência normal ou atípica (Figura 3) (CUMMINS *et al.*, 2006). No estudo de Garbe *et al.* (1994), foi observado que quanto maior a presença de nevos comuns na superfície do corpo, e com presença de cinco ou mais nevos atípicos, há um aumento do risco relativo de desenvolver MM.

**Figura 3. Indivíduo com nevos atípicos**



Fonte: Thompson, Scolyer e Kefford (2005)

Outra relação é a presença de histórico familiar de melanoma. Aproximadamente 10% dos pacientes com MM relatam histórico familiar de melanoma. Alguns casos podem ter origem de uma mutação herdada, como os genes *CDKN2A* (inibidor de cinase dependente de ciclina 2A) e *CDK4* (cinase dependente de ciclina 4). Mutações herdadas neste gene estão presentes em 30% a 40% das famílias com três ou mais membros com MM (TSAO *et al.*, 2004).

Características fenotípicas como pele, cabelo e olhos claros, bem como ancestralidade podem também influenciar no desenvolvimento da doença. A possibilidade de desenvolver o melanoma em pessoas com pele clara é estimado em 1:50, comparado com 1:1000 com pessoas de pele escura, de origem afro-americana (KABIGTING *et al.*, 2009). A baixa incidência de melanoma — em pessoas de origem asiática, hispânica e em negros — pode ser resultado de um efeito protetor exercido pela pigmentação escura da pele. O aumento da densidade de melanina na pele pode reduzir a frequência de melanoma e de outros cânceres de pele (CRESS e HOLLY, 1997).

Em um estudo de Bakos *et al.* (2009), foi avaliada a importância da ancestralidade como fator de risco para o melanoma. Em uma amostra da região Sul do Brasil, onde a proporção de indivíduos com a pele mais clara é alta e o MM é mais prevalente, pessoas com ascendência alemã e italiana demonstraram ter um fator de risco alto para esse tipo de câncer de pele. Por outro lado, indivíduos com ascendência indígena brasileira revelaram um menor risco para o desenvolvimento dessa doença. A maior tendência em indivíduos com aquela ascendência pode estar relacionado não somente pelo fenótipo claro da pele, mas também pelas mutações genéticas herdadas dos imigrantes Europeus (BAKOS *et al.*, 2009).

Muitos mecanismos moleculares têm sido estudados na patogenia do melanoma, por estarem envolvidos na alteração clonal primária dos melanócitos neoplásicos, incluindo aqueles que induzem à proliferação (via proliferativa) ou superação da senescência celular (via de senescência) e, por outro lado, vias que reduzem a apoptose (vias apoptóticas) (PALMIERI *et al.*, 2009). Entre essas vias moleculares envolvidas na patogenia do melanoma, destaca-se a via das MAPK (Figura 4).

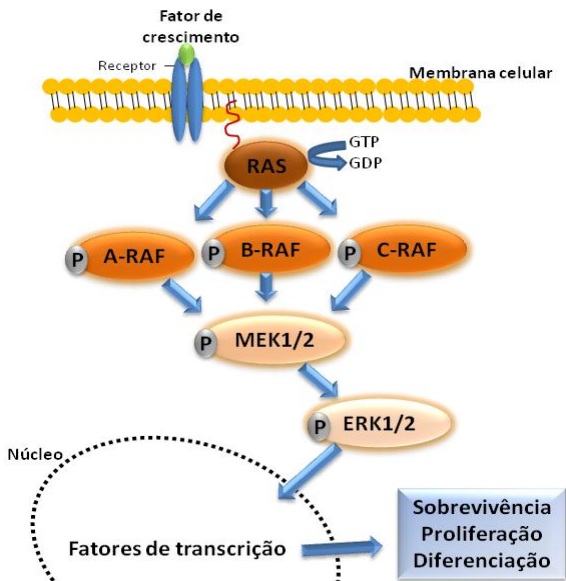
### 2.3 VIA DAS MAPK (PROTEÍNA CINASE ATIVADA POR MITÓGENO)

A via das MAPK também é conhecida como via da ERK/MAPK (RIBAS e FLAHERTY, 2011). Essa via clássica é ativada por receptores ligados à membrana, que inclui receptor tirosina cinase e receptores acoplados à proteína G. A estimulação desses receptores proporciona a ativação da pequena GTPase RAS. A RAS ativa a proteína RAF (A-RAF, B-RAF e C-RAF), que fosforila e ativa a MEK1/2, que, por sua vez, fosforilam e ativam a ERK1/2. A ERK1 ou ERK2 ativada regulam a expressão gênica pela fosforilação de inúmeros fatores de transcrição, que regulam a proliferação, sobrevivência, apoptose, diferenciação e metabolismo celular (Figura 4) (O'NEILL e KOLCH, 2004; WELLBROCK, KARASARIDES e MARAIS, 2004; ZUIDERVAART *et al.*, 2005).

Em condições fisiológicas, a exposição da pele a radiações UV induz à diferenciação de melanócitos, mas também pode desencadear proliferação, e a via das MAPK desempenha um papel essencial em ambos os processos (WELLBROCK e HURLSTONE, 2010).

As alterações da via da MAPK são comuns em muitos tipos de câncer, incluindo o melanoma. Mutações em RAS (N-RAS) ocorrem em aproximadamente 20% dos melanomas (BUCHHEIT *et al.*, 2013), mutações em RAF (B-RAF), em aproximadamente 60% dos casos (DAVIES *et al.*, 2002; BUCHHEIT *et al.*, 2013). De fato, essa via é essencial na biologia das células melanocíticas e, conseqüentemente, na gênese do melanoma (WELLBROCK e HURLSTONE, 2010). Com isso, muitos pesquisadores vêm investigando essa via para melhor compreendê-la e testando novos alvos terapêuticos ou estratégias com combinações de fármacos.

**Figura 4. Via central das MAPK**



Adaptado de: Wellbrock e Hurlstone (2010); Cheng, Zhang e Li, (2013)

## 2.4 ALVO EM RAS

Historicamente a proteína RAS (palavra derivada de *Rat Sarcoma vírus* ou vírus do sarcoma de rato) foi o primeiro oncogene descrito em câncer humano. A RAS é uma pequena proteína G (21 quilodaltons) que é ativa com GTP e inativa com GDP (JARELL,



LAWRENCE e TSAO, 2007). Essa proteína é fundamental para várias vias de sinalização celular que controlam importantes processos celulares, tais como: integridade do citoesqueleto, proliferação celular, adesão, apoptose e migração. Proteínas RAS mutadas são oncogênicas, pois são capazes de ativar vias efetoras *downstream*, sem qualquer estímulo *upstream*. Alguns efeitos nas vias *downstream* incluem cinases RAF e fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (CHENG, ZHANG e LI, 2013).

No câncer, os principais genes membros da superfamília RAS mutados são H-RAS, K-RAS e N-RAS encontrando-se alterações em aproximadamente 15% dos casos (DAVIES *et al.*, 2002). Para o melanoma, a N-RAS é mutada com mais frequência do que a H-RAS ou K-RAS. Mutações em N-RAS ocorrem aproximadamente entre 15% a 25% das linhagens celulares de melanoma e tumores primários, podendo chegar a 26% das amostras de melanoma metastático (DEMUNTER *et al.*, 2001; DAHL e GULDBERG, 2007). Entre eles, substituição de glutamina por lisina (Q61K) e glutamina por arginina (Q61R) no códon 61 são as mutações que ocorrem com maior frequência (JAFARI *et al.*, 1995; DEMUNTER *et al.*, 2001; BUCHEIT *et al.*, 2013). Essas mutações também ocorrem com mais frequência em melanomas nodulares e melanomas causados pela exposição excessiva às radiações solares (JAFARI *et al.*, 1995). Além disso, pacientes com alteração em N-RAS demonstraram uma pior evolução clínica, apresentaram tumores mais espessos, alta taxa mitótica e menor sobrevivência em comparação com pacientes com mutação B-RAF<sup>V600E</sup> ou sem mutação em N-RAS e B-RAF (DEVITT *et al.*, 2011). Contudo, pesquisas têm sido realizadas na busca de inibidores farmacológicos para a proteína RAS. Porém, os resultados ainda são desfavoráveis e relativamente ineficazes (CHENG, ZHANG e LI, 2013). Devido à prevalência de mutações em N-RAS, compostos com alvo em RAS podem ser bons candidatos a agentes antitumorais (KLOOG e COX, 2000).

Para a proteína RAS ser ativada, ela requer uma localização na membrana celular. Essa localização demonstra ser dependente de farnesilação, uma modificação pós-traducional mediada pela enzima farnesiltransferase (FTase). Uma vez que a FTase é essencial para ativação da RAS, inibidores da FTase têm sido investigados como agentes antitumorais pelo alvo em FTase e, conseqüentemente, inibindo a RAS. Respostas clínicas com o uso desses inibidores não foram frequentes e a abordagem de inibição da via com alvo localizado na

membrana necessita de mais investigação (KELLEHER e MCARTHUR, 2012).

Outro foco está no desenvolvimento de inibidores seletivos das vias *downstream* que são ativados pela RAS. Os inibidores da MEK (MEK162) demonstraram resultados interessantes em pacientes com mutação em N-RAS. Porém, inúmeros efeitos colaterais foram relatados, como dermatite acneiforme, em 60% dos pacientes com mutação em N-RAS; *rash* cutâneo, em 20%; edema periférico e edema facial, em aproximadamente 30%; diarreia, em 27%; aumento da creatinofosfoquinase, em 37% dos pacientes (ASCIERTO *et al.*, 2013).

Outra abordagem para atingir diretamente a RAS é bloqueando a expressão com oligonucleotídeos antisense ou pequenos RNAs de interferência (siRNA). Entretanto, a entrega de ácidos nucleicos terapêuticos *in vivo* continua sendo um desafio, pois essas moléculas são instáveis na circulação e necessitam de alguma proteção para permitir a entrega da molécula (CHENG, ZHANG e LI, 2013).

A N-RAS é um oncogene importante no melanoma, que desempenha um papel central na biologia dos melanomas que apresentam mutações em N-RAS. Embora atualmente não exista uma terapia específica para essa mutação, as investigações nesse alvo são promissoras. Ensaios clínicos estão em andamento. Eles combinam inibidores da via PI3K com fármacos que visam inibir a via da ERK em melanomas mutados em N-RAS (KELLEHER e MCARTHUR, 2012).

## 2.5 ALVO EM B-RAF

A proteína RAS pode ativar a RAF. A RAF pertence à família de proteínas cinases serina/treonina que consiste em três membros: A-RAF, B-RAF e C-RAF, que diferem em suas distribuições nos tecidos e possuem funções reguladoras únicas. A molécula de sinalização da cinase RAF tem sido envolvida em uma variedade de processos celulares, como crescimento, proliferação, sobrevivência, diferenciação e transformação (JARELL, LAWRENCE e TSAO, 2007).

A B-RAF é o gene mais frequentemente mutado na via das MAPK e desempenha um papel importante na patogênica do melanoma. Encontra-se mutada em 50 a 70% dos melanomas, 30 a 50% dos cânceres da tireoide, 5 a 20% dos cânceres colorretais, em

aproximadamente 30% de cânceres de ovário e também com baixa frequência (1 a 3%) em outros tipos de cânceres (WELLBROCK, KARASARIDES e MARAIS, 2004). No estudo realizado por Davies *et al.* (2002), foi identificada a B-RAF como um oncogene em melanoma e encontraram 66% das amostras mutadas. Durante os últimos anos, muitos aminoácidos têm sido identificados como alvos para essa mutação no melanoma. No entanto, aproximadamente 80% das mutações resultam da substituição do ácido glutâmico por valina, no códon 600 (B-RAF<sup>V600E</sup>), ocorrendo hiperativação da cinase (GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007). Interessante é que mutações em B-RAF ocorrem em mais de 80% de nevos benignos, sugerindo que tais alterações genéticas são eventos precoces no desenvolvimento do melanoma (POLLOCK *et al.*, 2003; CHENG, ZHANG e LI, 2013).

O primeiro inibidor da B-RAF estudado em ensaios clínicos foi o sorafenibe (Nexavar<sup>TM</sup>). Além da RAF, o sorafenibe também inibe o crescimento do tumor e a angiogênese. Em 2006, no estudo randomizado de fase II, pesquisadores consideraram o sorafenibe um agente bem tolerável. Porém, não conseguiram identificar atividade antitumoral em pacientes com melanoma metastático (EISEN *et al.*, 2006). A combinação do sorafenibe com outros quimioterápicos como a carboplatina e o paclitaxel também não demonstrou benefícios para o tratamento do melanoma (HAUSCHILD *et al.*, 2009).

O dabrafenibe (GSK2118436) é outro inibidor específico da B-RAF. Em estudos clínicos, com administração de 150 mg duas vezes ao dia, resultou em boas respostas em 69% dos pacientes com mutação B-RAF<sup>V600E</sup>. Em pacientes com metástases cerebrais, nove dos dez pacientes tiveram redução no tamanho das lesões (FALCHOOK *et al.*, 2012). Em outro estudo, comparando os resultados com dacarbazina (primeiro quimioterápico aprovado pelo FDA para o melanoma metastático), foi observada uma melhor taxa de resposta (50 vs 6%) e sobrevida sem progressão tumoral (5,1 vs 2,7 meses) (HAUSCHILD *et al.*, 2012). Porém, foram identificados efeitos adversos causados pelo dabrafenibe, entre eles o surgimento de carcinoma de células escamosas ou ceratoacantoma, fadiga e pirexia (FALCHOOK *et al.*, 2012).

O vemurafenibe (PLX4032) é um potente inibidor da B-RAF, que foi aprovado pelo FDA em 2011 (Figura 5) para o tratamento do melanoma metastático em pacientes com mutação V600E da B-RAF. No estudo de fase I, foi estabelecida a dose máxima tolerada de 960 mg, administrada duas vezes ao dia, e observaram regressão tumoral parcial

ou completa na maioria dos pacientes (FLAHERTY *et al.*, 2010). No estudo randomizado de fase III, comparou-se o efeito do vemurafenibe *versus* dacarbazina em 675 pacientes com melanoma metastático mutados em B-RAF<sup>V600E</sup>. Os resultados mostraram que o vemurafenibe aumentou a sobrevida total em 84%, comparando-se com 64% do grupo da dacarbazina. A taxa de resposta foi de 48% para o vemurafenibe e 5% para dacarbazina. Embora os estudos clínicos com o vemurafenibe resultassem em boa resposta ao tratamento e aumento da sobrevida global, os efeitos adversos e a resistência são problemas para este tratamento. Além dos efeitos colaterais comuns, câncer de pele não melanoma, incluindo carcinoma de células escamosas (12%) e ceratoacantoma (8%) são eventos relatados pelos pacientes em aproximadamente três meses de tratamento (FLAHERTY *et al.*, 2010; CHAPMAN *et al.*, 2011). O efeito do vemurafenibe na indução de cânceres de pele não melanoma pode ocorrer pela ativação da ERK em células não tumorais. Os mecanismos para entender a resistência do vemurafenibe são complexos, e vários modelos têm sido estabelecidos para evitar resistência. As mutações em N-RAS poderiam ser antecipadas para restaurar a via das MAPK, via C-RAF, mesmo a B-RAF sendo inibida pelo vemurafenibe. Em um estudo, analisando as lesões na pele provocadas pelo vemurafenibe, identificaram-se mutações em RAS em 60% das amostras, sendo a maioria mutações H-RAS Q61L (SU *et al.*, 2012). Além dos problemas relacionados com resistência e efeitos colaterais causados pelo vemurafenibe, outra questão discutida é o alto custo do tratamento. O custo para prevenir uma morte é de 240.000 dólares. Prevendo-se o surgimento de 8.700 casos de melanoma metastático, e que aproximadamente metade dos pacientes apresentem mutações em B-RAF<sup>V600E</sup>, 3.480 pacientes teriam que ser tratados para evitar ou atrasar um máximo de 870 mortes dentro de seis meses após o tratamento, a um custo total de 208.000.000 de dólares. Desse modo, permanece incerto se o uso do vemurafenibe seria viável pelo Sistema Único de Saúde (MORITA e NAGAI, 2011).

## 2.6 OUTROS ALVOS

A dacarbazina foi o primeiro medicamento aprovado pelo FDA para o tratamento do melanoma metastático (Figura 5). Trata-se de um agente alquilante que exerce atividade antitumoral por metilação do ácido nucleico causando danos ao DNA. Contudo, a taxa de resposta é de 10 a 25% e uma resposta completa em apenas 5% dos pacientes. Em

um estudo *in vivo*, foi observado que quando a dacarbazina foi utilizada como monoterapia, o volume do tumor e o potencial metastático eram elevados (LEV *et al.*, 2004). Entretanto, quando a dacarbazina foi associada com outros fármacos como cisplatina, vimblastina, interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) e IL-2, pareceu produzir um aumento no número de respostas duráveis em pacientes com melanoma metastático, porém a toxicidade causada foi elevada (LEGHA *et al.*, 1996).

Outras estratégias para o tratamento do melanoma são as imunoterapias. Em 1998, o FDA aprovou o tratamento com IL-2 (Interleucina-2), que demonstrou taxa de resposta de aproximadamente 16% (ATKINS *et al.*, 1999). O tratamento com IL-2 estimula a formação de células do sistema imune o que pode auxiliar na eliminação do tumor. No entanto, devido à alta toxicidade e baixa resposta, a IL-2 é utilizada em poucas situações clínicas (ATKINS *et al.*, 1999; SULLIVAN, LORUSSO e FLAHERTY, 2013). Em 2011, o ipilimumab, um anticorpo monoclonal, demonstrou aumento na sobrevida dos pacientes. Por isso, foi aprovado pelo FDA para o tratamento de pacientes com melanoma metastático (Figura 5). O ipilimumab bloqueia o CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito-T citotóxico), inibidor natural da resposta imunológica. Com isso, ocorre ativação de células-T, proliferação e infiltração de linfócitos para o tumor. Contudo, em um estudo clínico utilizando o ipilimumab como monoterapia, resultou em modesta taxa de resposta e efeitos adversos graves como enterocolite, hepatite e dermatite (HODI *et al.*, 2010).

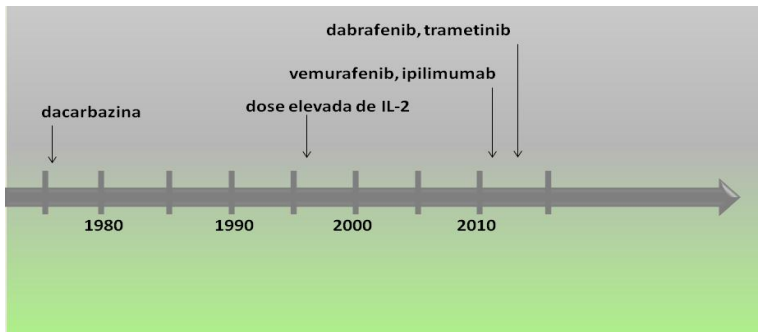
A resistência à terapia aos inibidores da B-RAF é associada com a reativação da via das MAPK. Para resolver esse problema, foi utilizada a combinação de inibidores da B-RAF com inibidores da MEK (trametinibe). A associação de dabrafenibe (inibidor da B-RAF) e trametinibe resultou em melhor evolução clínica e menor toxicidade. O trametinibe pode reduzir a possibilidade de o paciente desenvolver lesões na pele pela supressão da ativação da via das MAPK (FLAHERTY *et al.*, 2012). Esses compostos, dabrafenibe e trametinibe, foram aprovados pelo FDA em 2013 para o tratamento do melanoma metastático (Figura 5) (HOOD e VANLANDINGHAM, 2013). Outros estudos que avaliam a combinação com inibidores da B-RAF (vemurafenibe) e MEK estão sendo realizados (CHENG, ZHANG e LI, 2013).

Segundo a Portaria n. 347 de 8 de abril de 2013, do Ministério da Saúde do Brasil, as estratégias adotadas nos centros de saúde para o tratamento do melanoma utilizam o esquema com dacarbazina,

vimblastina, IL-2 e IFN- $\alpha$ . Para essa associação, são descritas taxas de resposta de aproximadamente 50% e sobrevida prolongada em cerca de 6% dos pacientes. Nenhum medicamento ou combinação de medicamentos comercializados no Brasil comprovadamente aumentaram as taxas de sobrevida global para o melanoma metastático. Segundo essa Portaria, dos medicamentos disponíveis, nenhum tratamento demonstrou ser mais eficaz e ter custo mais efetivo do que a dacarbazina, recomendando-se, nessas diretrizes, seu uso em pacientes em condições clínicas de tolerar a quimioterapia como primeira linha de tratamento sistêmico. O Ministério da Saúde não recomenda o uso do vemurafenibe e do ipilimumabe para pacientes com melanoma disseminado, visto não haver evidência de claro benefício global em termos de sobrevida. Quando houver mais evidências a serem analisadas, esses medicamentos deverão ser submetidos à Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias do SUS (CONITEC) (BRASIL, 2014).

A descoberta, em 2002, de mutações em B-RAF no melanoma, revela um novo alvo molecular, estimulando o desenvolvimento de moléculas para este tipo de câncer, incrementando a abordagem das terapias (WELLBROCK e HURLSTONE, 2010). Novas investigações visam entender e superar as resistências dos compostos e melhorar a sua eficácia.

**Figura 5. Tratamentos aprovados pelo FDA para o melanoma metastático.**



**A dacarbazina (1976) e a IL-2 (1998) foram os únicos fármacos aprovados entre 1976 e 2011. Em 2011, vemurafenibe e ipilimumabe e, em 2013, dabrafenibe e trametinibe foram aprovados.**

Adaptado de: Sullivan, Lorusso e Flaherty, ( 2013)

## 2.7 APOPTOSE E MELANOMA

O melanoma é muito resistente aos quimioterápicos atuais e, nos estágios avançados da doença, os índices apoptóticos são muito baixos. Neste sentido, a busca para encontrar alterações moleculares no processo de morte celular vem adquirindo intensidade. Essas alterações podem estar relacionadas com a ativação de fatores antiapoptóticos, inativação dos efetores pró-apoptóticos e reforço nos sinais de sobrevivência. Essas alterações, nas vias da apoptose, despertam interesse como alvo na intervenção terapêutica (SOENGAS e LOWE, 2003).

A apoptose é um programa de morte celular altamente regulado, que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e homeostase dos tecidos eliminando células desnecessárias e com defeitos. Essa forma de morte erradica as células potencialmente prejudiciais, especialmente as células geneticamente alteradas. Assim, serve para manter a integridade do organismo (KERR, WYLLIE e CURRIE, 1972).

A apoptose é caracterizada por alterações no citoesqueleto que induzem contração celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, eventuais brotamentos na membrana, proporcionando a aparência de núcleos picnóticos, formação de vesículas sem perda de integridade de membrana e sem resposta inflamatória (KERR, WYLLIE e CURRIE, 1972; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2005). Ela pode ser dividida em fase de indução, fase efetora e de degradação. A fase de indução é altamente dependente do tipo de estímulo apoptótico recebido pela célula, por via endógena ou por receptores de superfície com domínios de morte. Na fase efetora, ocorre a ativação da cascata de caspases, constituída da ativação de proteases, nucleases e de outros intermediários que participam dessa fase. Na fase de degradação, a célula adquire características bioquímicas e morfológicas características desse processo (GREEN e KROEMER, 1998).

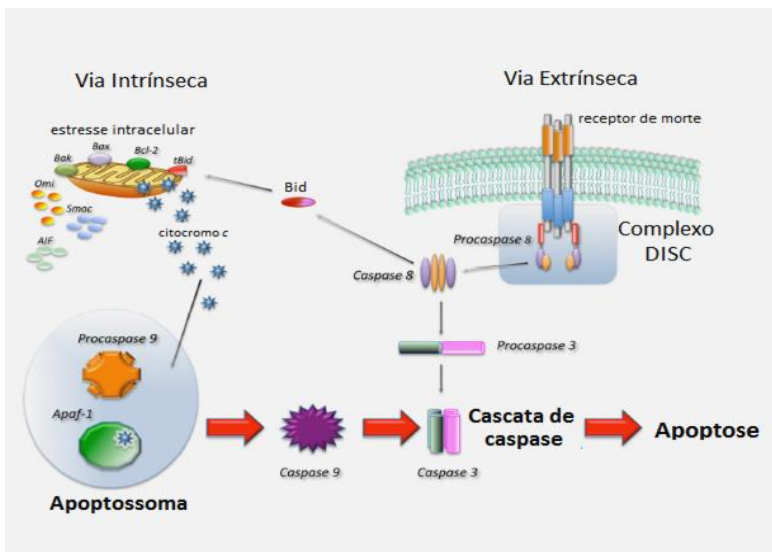
Outra característica desse tipo de morte é a exposição, na porção externa da célula, do fosfolípide denominado fosfatidilserina (FS). A FS é mantida normalmente em seu folheto interno e serve como um sinal para fagocitose da célula apoptótica por macrófagos e células adjacentes. Desse modo, a reação inflamatória é minimizada ou ausente,

o que evita o comprometimento de estruturas sadias dos tecidos (FADOK *et al.*, 2001).

As principais vias de regulação de apoptose são: via intrínseca, mediada pela mitocôndria, e via extrínseca, que é mediada por receptores de morte. A via extrínseca é induzida por sinais extracelulares que se ligam a receptores de morte celular (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de Fas). Após ocorrer a ligação de uma molécula ao receptor, há formação de um complexo multiproteína, conhecido como DISC (complexo de sinalização indutor de morte) que leva a ativação da cascata de caspases (FAVALORO *et al.*, 2012). A sinalização do complexo FAS/CD95 (membro do receptor de morte) induz a sinalização de DISC, que pode conduzir à ativação da caspase-8, bem como à ativação da caspase *downstream*, caspase-3, resultando em apoptose (Figura 6) (LAVRIK e KRAMMER, 2012). A via intrínseca é ativada em resposta a inúmeras situações de estresse, como danos ao DNA, estresse oxidativo, hipóxia, entre outras. Em todos os casos, sinais são transferidos em resposta a esse estresse e convergem diretamente para a mitocôndria, ocorrendo liberação de proteínas que contribuem para ativação das caspases. As proteínas da família Bcl-2 são essenciais para o funcionamento dessa via. Elas podem ser classificadas como membros antiapoptóticos tais como, Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w e Mcl-1 e membros pró-apoptóticos como Bax, Bak, Bok, Bcl-xs, Bad, Bid, Bik, Bim, Noxa, Puma. Uma vez que ocorre dissipação do potencial de membrana mitocondrial, provocada por essas proteínas, há liberação de fatores apoptogênicos como o citocromo *c*, AIF (fator indutor de apoptose), ATP e proteínas de choque térmico. Ocorre a formação do apoptossomo, que é uma proteína complexa que contém o citocromo *c*, APAF-1 (fator de ativação de proteases pró-apoptóticas 1) e caspase-9. A partir do momento em que o citocromo *c* for liberado, a cascata de ativação das caspases torna-se irreversível. Portanto, como resultado final, ocorre ativação das caspases, eficientes proteases, que quebram proteínas celulares específicas e estão associadas à degradação do DNA (Figura 6) (MITA, MITA e TOLCHER, 2006; FAVALORO *et al.*, 2012). A via intrínseca e a extrínseca não são completamente independentes. Em algumas células, a caspase-8 pode clivar uma proteína Bid gerando um fragmento truncado tBid, que pode permeabilizar a mitocôndria resultando, por exemplo, em liberação do citocromo *c* até a morte por apoptose (Figura 6) (FAVALORO *et al.*, 2012).



**Figura 6. Representação esquemática das vias que levam à apoptose.**



A via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de morte, formação do complexo DISC e ativação da caspase-8. Na via intrínseca, ocorre liberação do citocromo c da mitocôndria e ativação da caspase-9. A caspase-8 e a caspase-9 ativam as caspases *downstream*, tais como caspase-3, e resultam em morte celular.

Adaptado de: Favaloro, B. *et al.*, (2012)

Na maioria dos casos a ocorrência de apoptose depende das caspases, também conhecidas como enzimas aspartato-específicas. Trata-se de proteases que são sintetizadas em células normais como pró-enzimas inativas (zimogênios). Elas podem ser rapidamente ativadas por clivagem autoproteolítica ou por clivagem por outras caspases, em resíduos específicos de ácido aspártico (THORNBERRY e LAZEBNIK, 1998; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2005). Dois tipos de caspases atuam nas vias de sinalização para apoptose. São denominadas de iniciadoras (caspase-2, -8, -9, -10) e efetoras (caspase-3, -6, -7), sendo responsáveis pelas características típicas do processo de morte celular. Também há evidências de que a via das caspases, quando desreguladas, ajudam a manter as células cancerosas ativas. No entanto, quando desempenham suas funções normais, podem atuar como

supressores tumorais e prevenir a formação do tumor em um organismo (OLSSON e ZHIVOTOVSKY, 2011).

Considerando que a apoptose é essencial para a existência, é evidente que ela pode desempenhar um papel na patogênese de muitas doenças como no câncer, em que o acúmulo de células é resultado da excessiva proliferação celular e/ou de apoptose insuficiente. Mutações em genes pró-apoptóticos e aumento da expressão ou atividade de proteínas antiapoptóticas resultam em diminuição de apoptose e crescimento exacerbado de células malignas (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2005).

Como comentado anteriormente, mutações em RAS e B-RAF podem interferir em vários níveis nas vias de sinalização AKT/NF- $\kappa$ B, RAF/MAPK. Como resultado, uma mistura de sinais de sobrevivência são direcionados para impedir pontos de checagem no ciclo celular, favorecer a metástase e bloquear estímulos pró-apoptóticos. Apoiando essa hipótese, a superexpressão de N-RAS em células de melanoma, pode aumentar a expressão de Bcl-2 (proteína antiapoptótica) e contribuir para a formação do tumor e da resistência aos quimioterápicos (JANSEN *et al.*, 1997; SOENGAS e LOWE, 2003). A superexpressão de B-RAF é também um potente inibidor de apoptose. Essa atividade antiapoptótica bloqueia a ativação das caspases, indicando que a sinalização de B-RAF/MEK/ERK pode inibir a apoptose em nível de ativação das caspases, bloqueando a liberação do citocromo *c* pela ação dos membros da família Bcl-2 (ERHARDT, SCHREMSEER e COOPER, 1999).

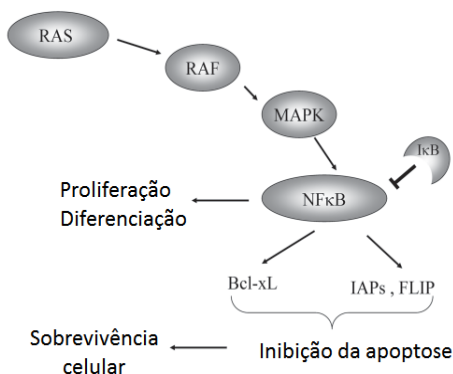
Em alguns casos, a molécula Apaf-1 é essencial para induzir a apoptose. Muitas vezes, o melanoma metastático possui expressão diminuída de Apaf-1 que atua com o citocromo *c* e a caspase-9. A diminuição da expressão dessa molécula torna esse tipo de câncer muito resistente à quimioterapia e incapaz de realizar um programa de morte por apoptose. A recuperação de Apaf-1, para alguns tipos de melanoma, poderia trazer benefícios na terapia (SOENGAS *et al.*, 2001).

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que está ligado na via de sobrevivência e morte. Ele funciona como um modulador de inflamação, angiogênese, diferenciação, ciclo celular, adesão, migração e sobrevivência (Figura 7). O NF- $\kappa$ B é também um fator antiapoptótico, induzindo a transcrição de inúmeras proteínas, como Bcl-xl, proteínas associadas ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF-1 e TRAF-2), além de proteínas inibidoras da apoptose (proteínas 1 e 2 - IAP). Portanto, o NF- $\kappa$ B inibe a atividade das caspases, aumenta a expressão

de ciclina D, que está envolvida na progressão do ciclo celular. Alguns componentes da família do NF- $\kappa$ B podem estar superexpressos no núcleo de nevos displásicos e em células de melanoma, comparados com nevos e melanócitos sem alterações. A ativação do NF- $\kappa$ B pode ocorrer devido à desregulação em vias de sinalização, tais como RAS/RAF e PI3K/AKT. Nas células, essas alterações provocam um aumento da proliferação e resistência à apoptose. Além disso, sua ativação pode estimular mediadores pró-inflamatórios que conduzem à inflamação aguda, à lesão de múltiplos órgãos e ao desenvolvimento de disfunções, como o câncer. Sendo assim, a inibição do NF- $\kappa$ B pode ser uma estratégia para interferir na patogênese e progressão do melanoma (MADONNA *et al.*, 2012).

Muitas estratégias para o tratamento do melanoma têm sido estudadas na identificação de novos alvos terapêuticos que induzam à apoptose. Várias investigações provam seus benefícios, mas muitas vezes não passam dos ensaios clínicos (ROCKMANN e SHADENDORF, 2006).

**Figura 7. Via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B.**



**No contexto de controle de morte celular, o NF- $\kappa$ B modula a expressão de fatores de sobrevivência.**

Adaptado de: Rockmann e Shadendorf (2006)

## 2.8 CICLO CELULAR E MELANOMA

No câncer, na maioria dos casos, as células adquirem mutações e alterações na expressão de diversos genes. Muitos desses genes estão envolvidos nos pontos de checagem do ciclo celular, que estão relacionados com controle, reparação do DNA e com a progressão do ciclo da célula (PARK e LEE, 2003).

A vida de uma célula é ritmada pelo ciclo celular, situação em que cada célula de um organismo sofre modificações cíclicas que a conduzem à divisão e à formação das células-filhas. O ciclo pode ser dividido em quatro fases: a fase G (G de *gap* - intervalo), durante a qual a célula cresce devido às sínteses de proteínas; a fase S (síntese), durante a qual a célula duplica seu DNA; a fase G<sub>2</sub>, que é outra fase de crescimento; a fase M (mitose), que representa a divisão celular propriamente dita. A fase de mitose ainda pode ser dividida em prófase, metáfase, anáfase e telófase. E quando as células cessam a proliferação, devido a sinais antimitóticos, elas saem do ciclo celular e entram para um estado de repouso, conhecido como G<sub>0</sub>. Além disso, o ciclo celular pode ser arrastado para pontos de checagem em G<sub>1</sub> ou G<sub>2</sub>, que irão controlar o tamanho da célula, os sinais de crescimento extracelulares e a integridade do DNA (PARK E LEE, 2003; VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003).

A transição de uma fase do ciclo para outra ocorre de forma ordenada e é regulada por diferentes proteínas celulares. As cinases dependentes de ciclinas (CDK) são proteínas reguladoras e são ativadas em pontos específicos do ciclo celular (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003). Outra proteína importante, que participa nos pontos de checagem do ciclo das células, é a p53. Essa proteína é acionada com o objetivo de reparar possíveis danos que possam acontecer ao DNA (TAYLOR e STARK, 2001). A p53 induz a expressão da proteína p21 (proteína inibidora da ciclina cinase). A p21 superexpressa tem, como consequência, a parada do ciclo celular na fase G<sub>1</sub>. Dado ao seu importante papel na manutenção do ciclo celular, não surpreende que a perda de atividade da p53 seja um evento recorrente em diversos tumores (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN, 2003).

Em câncer, mutações em genes envolvidos com o ciclo celular têm sido observadas, tais como: CDK, ciclinas, CKI, proteínas do ponto de checagem (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE e BERNEMAN,

2003). As células de melanoma podem apresentar defeitos significativos nos pontos de verificação das fases G1 e G2. Os melanomas com mutações em B-RAF apresentaram danos ao DNA pela falha de verificação no ponto G2. Ao contrário, melanomas N-RAS e B-RAF, sem mutações, exibem uma efetiva checagem em G2, porém um defeito significativo no ponto de verificação em G1. Linhagens de melanoma, com danos no DNA pela falta de checagem em G1, apresentam redução na expressão de p53 e expressão aumentada de genes associados com proliferação. Alterações na via de sinalização da p53 podem contribuir com o melanoma, por meio da atenuação do reparo do DNA, do ciclo celular, das funções de checagem, ou apoptose, reduzindo a morte celular (KAUFMANN *et al.*, 2008). As mutação em CDK4 (cinases dependentes de ciclina 4) também foram observadas em células de melanoma (WOLFEL *et al.*, 1995).

## 2.9 METÁSTASE E MELANOMA

A metástase é um processo complexo que ocorre por meio de uma série de passos sequenciais. Inclui invasão para os tecidos adjacentes, transporte por meio do sistema circulatório, parada em um local secundário, extravasamento e crescimento em um órgão secundário (MEHLEN e PUISIEUX, 2006).

Um acontecimento fundamental para o processo de invasão é a migração das células epiteliais neoplásicas que rompem o limite do tecido conjuntivo. Para que esse fenômeno ocorra, são necessárias alterações nas interações entre as células neoplásicas e a matriz extracelular e aumento na secreção das enzimas degradadoras da matriz. Dentre essas enzimas, destacam-se as metaloproteinases de matriz (MMPs) (MEHLEN e PUISIEUX, 2006).

As MMPs pertencem a uma família de endopeptidases que necessitam da presença de zinco para exercerem suas funções. Elas podem ser classificadas como colagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelinas (MMP-3 e -10), matrilisinas (MMP-7 e -26) e as MMPs ligadas à membrana. Os níveis de MMP em tecidos sadios são baixos ou indetectáveis. Entretanto, a expressão destas enzimas é aumentada na maioria das neoplasias malignas apresentando importante ação proteolítica nos processos de invasão e metástase. Nesse aspecto, as MMP-2 e -9 possuem um papel importante

na progressão tumoral, atuando diretamente sobre os componentes da membrana basal. Essas gelatinases apresentam funções como a fragmentação de laminina e de colágeno tipo IV, que são componentes fundamentais da membrana basal (STAMENKOVIC, 2000; HIDALGO e ECKHARDT, 2001). Altos níveis de MMP-2 e -9 são encontrados em casos com potencial invasão e metástase. Em câncer de pele metastático, as MMP-2 e -9 foram associadas a metástases em linfonodos, podendo ser consideradas como alvos moleculares para terapias antimetastáticas (PATEL *et al.*, 2005).

No melanoma metastático, moduladores apoptóticos estão desregulados sugerindo que a supressão de apoptose tem um papel essencial no processo metastático. Nos passos iniciais de disseminação metastática, normalmente se desencadeiam processos apoptóticos denominados *anoikis* e *amorphosis*. *Anoikis* e *amorphosis* são barreiras importantes para metástase (SIMPSON, ANYIWE E SCHIMMER, 2008). *Anoikis* é a morte celular induzida pelo rompimento da célula com a matriz, e *amorphis* é a morte estimulada pela perda da arquitetura do citoesqueleto. Proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2 superexpressa, podem influenciar nesses processos e aumentar a capacidade metastática (MEHLEN e PUISIEUX, 2006).

Estudos têm demonstrado também uma relação entre a ativação de RAS e a habilidade metastática de células tumorais. Mutações em RAS contribuem para aumentar a motilidade, a invasão e o potencial metastático das células (CAMPBELL e DER, 2004). Como exemplo, a inibição da expressão de H-RAS induziu à morte por apoptose, diminuiu a proliferação das células e alterou o potencial metastático (LIAO *et al.*, 2000). A RAS também é conhecida por promover a vascularização pelo aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular, indicando que a RAS afeta várias etapas que leva à metástase (MEHLEN E PUISIEUX, 2006).

A metástase é a principal causa de morte em câncer. A maioria dos pacientes com metástase responde temporariamente às terapias convencionais (STAMENKOVIC, 2000). O melanoma pode se metastatizar através da via sanguínea e via linfática. As metástases são mais frequentes nos gânglios linfáticos, na pele e no tecido subcutâneo. A detecção tardia das metástases corresponde ao mau prognóstico, pois a grande parte dos doentes tem a doença disseminada metastaticamente (ORGAZ E SANZ-MORENO, 2013).

## 2.10 NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O TRATAMENTO DO MELANOMA

Sais de isotiourônio, tiouréia e derivados constituem uma importante classe de compostos que exibem atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória (TRANI *et al.*, 1989; HOLLA *et al.*, 2003; BADAWI, AZZAM e MORSY, 2006).

Adicionalmente, esses sais podem ser sintetizados a partir de uma reação chamada *Morita-Baylis-Hillman* (MBH). Essa reação possui muitas vantagens como a facilidade de acesso, simplicidade operacional, excelente economia atômica e dispensa a utilização de metais pesados (BASAVAIAH, DHARMA RAO e SUGUNA HYMA, 1996; BASAVAIAH, RAO e REDDY, 2007).

Além disso, um recente estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou bons resultados utilizando sais de isotiourônio em linhagens de leucemia. Como resultado, esses sais apresentaram uma concentração que causa 50% de morte celular ( $CC_{50}$ ) entre 3-12  $\mu\text{M}$ . Os sais induziram morte celular por apoptose, geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e perda do potencial de membrana mitocondrial. Entre os sais, um deles, também promoveu bloqueio em G2/M, diminuindo a proliferação celular (ASSUNÇÃO, 2013).

Não foram encontradas na literatura pesquisas com os sais de isotiourônio, sais de *N*-fenilisotiourônio e sais de isotiossemicarbazidas em linhagens de melanoma, o que tomamos como objetivo deste trabalho, uma vez que sabemos da necessidade de pesquisar novos tratamentos para o melanoma metastático.





### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo principal avaliar os efeitos citotóxicos e antimetastáticos *in vitro* dos sais de isotiourônio, sal de *N*-fenilisotiourônio e sais de isotiossemicarbazidas, diante das diferentes linhagens de melanoma metastático.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar o efeito citotóxico dos sais de isotiourônio, de *N*-fenilisotiourônio e de isotiossemicarbazidas entre as linhagens de melanoma e a linhagem não tumoral de melanócito humano NGM;
- b) Avaliar a expressão dos genes N-RAS e B-RAF na linhagem SK-MEL-147, quando incubada com os compostos;
- c) Identificar alterações no ciclo celular e/ou fragmentação no DNA, provocadas pelos sais, diante das linhagens de melanoma (SK-MEL-147 e SK-MEL-28);
- d) Avaliar se os compostos induzem morte por apoptose na linhagem SK-MEL-147;
- e) Observar alterações morfológicas nas células (SK-MEL-147), provocadas pelos sais;
- f) Analisar o efeito do tratamento com os sais, na migração e invasão da linhagem SK-MEL-28;
- g) Comparar o efeito citotóxico dos sais nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-147 quando associados com o fármaco vemurafenibe (PLX4032).



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

Os principais reagentes utilizados neste trabalho encontram-se no quadro abaixo:

**Quadro 1 - Lista de reagentes**

Reagente	Sigla	Marca
brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio	MTT	Sigma® <sup>11</sup>
Ácido etanossulfônico de hidroxietil-piperazina	Hepes	Ludwig® <sup>7</sup>
Albumina sérica bovina	BSA	Sigma® <sup>11</sup>
Álcool Etilico	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Merck® <sup>8</sup>
Álcool isopropílico	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Merck® <sup>8</sup>
Anexina-V-FITC	-	BD Pharmingen™ <sup>1</sup>
Azul de Tripán	-	Sigma® <sup>11</sup>
Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	LAFAN® <sup>6</sup>
Cloreto de potássio	KCl	Vetec® <sup>14</sup>
Cloreto de sódio	NaCl	Vetec® <sup>14</sup>
Clorofórmio	CHCl <sub>3</sub>	Merck® <sup>8</sup>
Dimetilsulfóxido	DMSO	Synth® <sup>12</sup>
DNase kit	-	Thermo Scientific® <sup>13</sup>
Fator de crescimento epidermal	EGF	Sigma® <sup>11</sup>
Fosfato de sódio monobásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Synth® <sup>12</sup>
Glutaraldeído	-	Synth® <sup>12</sup>
Hidrocortisona	-	Sigma® <sup>11</sup>
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	-	Invitrogen™ <sup>5</sup>
Insulina	-	Sigma® <sup>11</sup>

**Quadro 1 - Lista de reagentes**

Reagente	Sigla	Marca
Iodeto de Propídio	IP	Sigma® <sup>11</sup>
Matrigel Matrix	-	Corning® <sup>2</sup>
Meio de cultivo celular (Dulbelco's Modified Eagle Medium)	DMEM	Gibco® <sup>4</sup>
Nutriente HAM-F12	HAM-F12	Cultilab® <sup>3</sup>
PCR 2X Master Mix Kit	-	Thermo Scientific® <sup>13</sup>
Penicilina/estreptomicina	-	Cultilab® <sup>3</sup>
RNase	-	Promega® <sup>9</sup>
Soro Fetal Bovino	SFB	Cultilab® <sup>3</sup>
<i>SYBR-Green</i>	-	Thermo Scientific® <sup>13</sup>
<i>PCR Master Mix</i>	-	
<i>SYBR-Safe DNA Gel Stain</i>	-	Invitrogen™ <sup>5</sup>
Triiodotreonina	-	Sigma® <sup>11</sup>
Tripsina	-	Cultilab® <sup>3</sup>
Triton X-100	-	Sigma® <sup>11</sup>
TRIzol	-	Invitrogen™ <sup>5</sup>
Vemurafenibe (PLX4032)	-	Selleck Chemicals® <sup>10</sup>

**Notas:**

<sup>1</sup>IBD Biosciences, San Jose, California  
EUA

<sup>2</sup>Corning, NY, EUA

<sup>3</sup>Cultilab, Campinas, SP, Brasil

<sup>4</sup>Gibco, Corporation, Grand Island, NY,  
EUA

<sup>5</sup>Invitrogen Corporation, Grand Island,  
NY, EUA

<sup>6</sup>LAFAN Química Fina, Várzea Paulista,  
SP, Brasil

<sup>7</sup>Ludwig Biotecnologia Ltda., Alvorada,  
RS, Brasil

<sup>8</sup>Merck, Darmstadt, Germany

<sup>9</sup>Promega Corporation, Madison, WI,  
EUA

<sup>10</sup>Selleck Chemicals®, EUA.  
<http://www.selleckchem.com/>

<sup>11</sup>Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis,  
MO, EUA

<sup>12</sup>Synth, Diadema, SP, Brasil

<sup>13</sup>Thermo Scientific, Waltham,  
Massachusetts, EUA

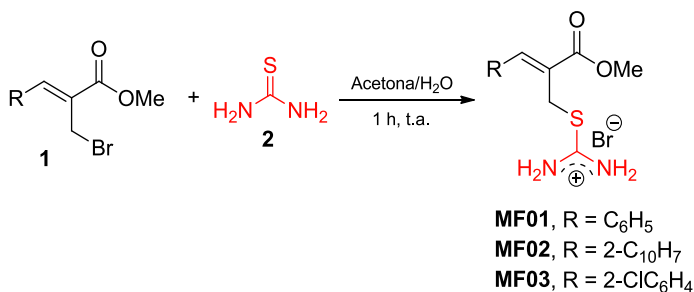
<sup>14</sup>Vetec Química Fina Ltda, Duque de  
Caxias, RJ, Brasil

## 4.2 SAIS DE ISOTIOURÔNIO, SAL DE *N*-FENILISOTIOURÔNIO E SAIS DE ISOTIOSSEMICARBAZIDA

Os sais (MF01, MF02, MF03, MF12, MF14 e MF15) utilizados neste trabalho foram sintetizados pelo químico Misael Ferreira, orientado pelo professor Marcus Mandolesi Sá, no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os sais MF01, MF02 e MF03 são derivados da tioureia, o sal MF12 é derivado de *N*-feniltioureia e os sais MF14 e MF15 são derivados de tiossemicarbazidas. As rotas de síntese dos sais estão descritas a seguir:

### Procedimento para a Síntese dos Sais de Isotiourônio MF01, MF02 e MF03.

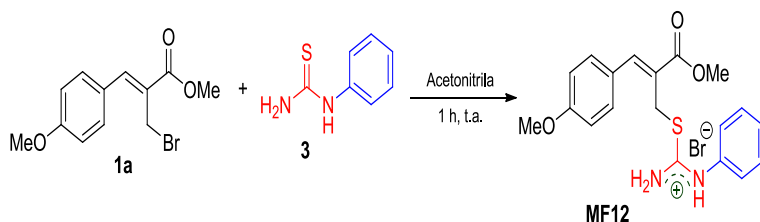
Em uma solução contendo 1,0 mmol de brometo alílico (**1**) e 5,0 mL de acetona/H<sub>2</sub>O (4:1 v/v) à temperatura ambiente foi adicionado 0,95 mmol de tioureia (**2**), e a mistura resultante ficou sob agitação constante por 1 hora. Após este tempo, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida em um evaporador rotativo e o sólido obtido foi triturado e lavado com éter etílico/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1 v/v), fornecendo como produto os respectivos sais de isotiourônio **MF01**, **MF02** ou **MF03**.



### Procedimento para a Síntese do Sal de *N*-fenilisotiourônio MF12.

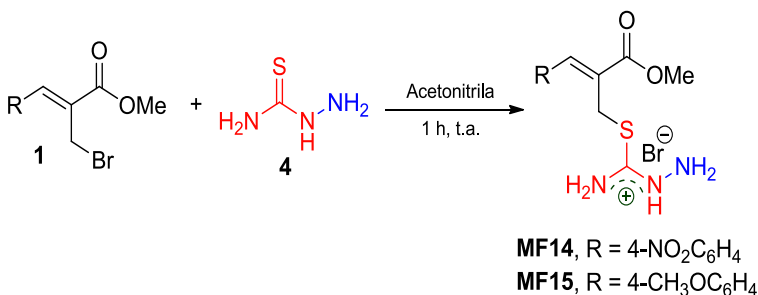
Em uma solução contendo 1,0 mmol do brometo alílico (**1a**) e 5,0 mL de acetonitrila à temperatura ambiente foi adicionado 0,95 mmol de *N*-feniltioureia (**3**), e a mistura resultante ficou sob agitação constante por 1 hora. Após este tempo, formou-se um sólido insolúvel o qual foi

isolado por meio de filtração e lavagem com acetonitrila, fornecendo o respectivo sal de *N*-fenilisotioúronio **MF12**.



### Procedimento para a Síntese dos Sais de Isotiossemicarbazida **MF14** e **MF15**

Em uma solução contendo 1,0 mmol de brometo alílico (**1**) e 5,0 mL de acetonitrila à temperatura ambiente foi adicionado 0,95 mmol de tiossemicarbazida (**4**), e a mistura resultante ficou sob agitação constante por 1 hora. Após este tempo, formou-se um sólido insolúvel o qual foi isolado por meio de filtração e lavagem com acetonitrila, fornecendo o respectivo sal de isotiossemicarbazida **MF14** ou **MF15**.



As estruturas, denominação, peso e fórmula molecular dos compostos estão demonstrados na Quadro 2.

Para este estudo, os sais MF01 e MF03 foram solubilizados em água e os sais MF02, MF12, MF14 e MF15, em DMSO. Essas soluções foram armazenadas a 4 °C. Para realização dos experimentos, as soluções-estoque foram diluídas em meio de cultura (DMEM) para atingirem as concentrações desejadas nos experimentos. Nos ensaios realizados, a concentração de DMSO não ultrapassou 1%.

**Quadro 2 - Estrutura química e características dos compostos**

Compostos	Estrutura	Peso e fórmula molecular
MF01 (sal de isotiourônio)		PM - 331.23 g/mol Fórmula - C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
MF02 (sal de isotiourônio)		PM - 381.29 g/mol Fórmula - C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
MF03 (sal de isotiourônio)		PM - 365.67 g/mol Fórmula - C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> BrClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
MF12 (sal de <i>N</i> -fenilisotiourônio)		PM - 437.35 g/mol Fórmula - C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S
MF14 (sal de isotiossemicarbazida)		PM - 391.24 g/mol Fórmula - C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> BrN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S
MF15 (sal de isotiossemicarbazida)		PM - 376.27 g/mol Fórmula - C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> BrN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S

## 4.3 CULTURA CELULAR

## 4.3.1 Linhagens Celulares

A linhagem celular murina B16-F10 e a linhagem celular humana NGM foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As linhagens humanas SK-MEL-147, SK-MEL-28 e SK-MEL-19 foram doadas pela Prof.<sup>a</sup> Ana Campa, da Universidade de São Paulo. As características das linhagens celulares estão listadas no Quadro 3.

**Quadro 3 - Características das linhagens celulares utilizadas**

Linhagem Celular	Mutação		Descrição	Organismo	Características adicionais
	<i>B-RAF</i>	<i>N-RAS</i>			
NGM	-	-	Nevos, linhagem não tumoral	<i>Homo sapiens</i>	Células heterogêneas que podem conter alguns queratinócitos <sup>1</sup>
B16-F10	-	-	Melanoma	<i>Mus musculus</i>	Utilizada em estudos de metástases <sup>2</sup>
SK-MEL-19	V599E <sup>*</sup>	WT <sup>°</sup>	Melanoma	<i>Homo sapiens</i>	-
SK-MEL-28	V600E <sup>#</sup>	WT <sup>°</sup>	Melanoma	<i>Homo sapiens</i>	-
SK-MEL-147	WT <sup>°</sup>	Q61R <sup>□</sup>	Melanoma	<i>Homo sapiens</i>	Não produz melanina

Fontes: Eberting *et al.* (2004)<sup>2</sup>; BCRJ, (2013)<sup>1</sup>; Takeda *et al.* (2011)<sup>2</sup>

**Notas:**

<sup>\*</sup>V599E- alteração em BRAF no éxon 15: T1796A levando à substituição de valina por ácido glutâmico no códon 599 (Davies *et al.*, 2002; Gorden *et al.* 2003); <sup>#</sup>V600E- mutação em BRAF no éxon 15: T1799A ocorrendo substituição de valina por ácido glutâmico no códon 600 ( Kaufmann *et al.* 2008; Lee, Choi e Kim, 2011); <sup>□</sup>Q61R- mutação predominante no códon 61, resultando na substituição de glutamina por arginina (Gorden *et al.* 2003; Kaufmann *et al.* 2008; Lee, Choi e Kim, 2011); <sup>°</sup>WT – *Wild Type* (Selvagem).



### 4.3.2 Cultivo celular: condições e manutenção

As linhagens celulares tumorais foram cultivadas em garrafas apropriadas para cultura celular contendo meio DMEM (pH 7,4), acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10% (v/v), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de HEPES e mantidas em estufa umidificada, a 37 °C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A linhagem não tumoral NGM foi cultivada em meio DMEM/HAM F12 (1:1), suplementada com SFB 20% (v/v), 1,4 µM de hidrocortisona, 1 nM de Triiodotreonina, 10 µg/mL de insulina, 10 µg/mL de transferrina, 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de HEPES e mantida nas mesmas condições que as linhagens tumorais. As células foram subcultivadas assim que atingiram aproximadamente 80% de confluência, utilizando solução tampão PBS (1x) para lavagem e, após, tripsina para dissociação celular. Os estoques celulares foram mantidos em DMEM contendo 10% de DMSO a aproximadamente -180 °C, em reservatório de nitrogênio líquido. Para realização dos experimentos, avaliou-se a viabilidade das células utilizando o reagente Azul de Tripán. A contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer.

### 4.4 VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de viabilidade celular utilizado foi o MTT. Esse método baseia-se na conversão do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em formazan púrpura, após a clivagem do anel de tetrazólio, principalmente por desidrogenases mitocondriais. O formazan púrpura é determinado espectrofotometricamente em 540 nm, sendo proporcional à viabilidade das células (MOSMANN, 1983). As células ( $1 \times 10^4$  células/poço) foram transferidas para placas de 96 poços, com concentrações crescentes dos compostos. Após 24, 48 ou 72 h, o sobrenadante foi removido e substituído por uma solução de MTT (5 mg/mL), seguido de incubação de 2 h a 37 °C. Após este período, o sobrenadante foi novamente removido e substituído por DMSO (100%), para dissolução do formazan púrpura. A absorbância foi medida em 540 nm em um leitor de microplacas. A densidade óptica do grupo-controle foi considerada como equivalente a 100% de células viáveis. A

concentração do composto, que causa 50% de morte celular ( $CC_{50}$ ), foi calculada com auxílio do programa *GraphPad Prism 5*, por meio de regressão não linear, com interpolação (50% de viabilidade) da curva (log da concentração *versus* resposta).

#### 4.5 ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O índice de seletividade (IS) foi calculado por meio da razão entre a  $CC_{50}$  da linhagem não tumoral e a  $CC_{50}$  da linhagem tumoral, conforme é demonstrado na fórmula a seguir:

$$IS = \frac{CC_{50} \text{ linhagem não tumoral}}{CC_{50} \text{ linhagem tumoral}}$$

Um IS maior que 1 (um) indica que a citotoxicidade do composto é superior para as células tumorais do que para células não tumorais (CALLACONDO-RIVA *et al.*, 2008).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE N-RAS E B-RAF

##### 4.6.1 Extração de RNA

A extração do RNA foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen™), conforme as instruções do fabricante, mas com algumas modificações. Em resumo,  $1 \times 10^6$  células/poço foram dispostas em placas de seis poços e após 24 h foram incubadas com os sais, durante 4 h. Depois disso, foi adicionado TRIzol®, incubado por cinco minutos, em temperatura ambiente. Para separação das fases, foi adicionado clorofórmio, agitado vigorosamente (15 s) e centrifugado a  $10.000 \times g$ , durante 15 min, a 4°C. A fase aquosa foi coletada e em seguida transferiu-se para um novo tubo, quando foi adicionada a mesma proporção de álcool isopropílico. Essa solução foi incubada por 15 min e, após este período, centrifugada novamente. O sobrenadante foi removido, o decantado foi lavado com álcool etílico 75% e centrifugado. O sobrenadante foi novamente removido e o decantado foi seco em

temperatura ambiente para ser dissolvido em água livre de RNase. O RNA extraído foi quantificado por leitura espectrofotométrica, em um Nanodrop e a pureza avaliada por meio da razão 260/280. Até 2 µg de RNA foram transferidas para microtubos de 0,2 mL e tratados com DNAase (conjunto Thermo Scientific®) em termociclador por 30 min a 37 °C, para após ser adicionado EDTA (25mM) e incubado em termociclador por 10 min a 65 °C.

#### 4.6.2 Síntese de cDNA

Para síntese de cDNA, foi utilizado o conjunto *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Invitrogen™) e procedeu-se conforme as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a – 20°C até sua utilização para as reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR). Todas as incubações foram realizadas em termociclador Biocycler (BioSystems, Curitiba, Brasil).

#### 4.6.3 RT-PCR

Para verificar a melhor temperatura de anelamento utilizou-se a técnica de PCR convencional seguindo as instruções do conjunto PCR *2X Master Mix* (Thermo Scientific). Para corrida, utilizou-se gel de agarose 1%, contendo Sybr Safe® (Invitrogen™). As temperaturas de anelamento testadas foram 55°C, 57°C, 60°C e 65°C.

#### 4.6.4 Curvas de eficiência da reação de PCR

Para determinar a eficiência da reação de PCR quantitativo, foi feita uma curva com diferentes concentrações de cDNA, para todos os pares de iniciadores (Quadro 4) visando determinar a concentração ideal de cDNA e a eficiência dos iniciadores para a reação de quantificação relativa. A amplificação foi realizada utilizando o *Power SYBR-Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific®). Para o cálculo de eficiência de amplificação dos produtos, foi utilizada a análise de regressão linear dos

valores de Ct (*Cycle threshold*), em função do logaritmo da concentração.

**Quadro 4 - Iniciadores utilizados na reação de PCR quantitativo (qPCR).**

	<i>Senso (5'-3')</i>	<i>Antissenso (5'-3')</i>
GAPDH	CAATGACCCCTTCATTGACC	GACAAGCTTCCCCTTCG
N-RAS	ACAAACTGGTGGTGGTTGGA	ATTGTCAGTGCCTTTTC
B-RAF	CTCCTGAATCGGGCTGGTT	GCCTGGATGGGTGTTTG

**4.6.5 Reação em cadeia da polimerase (qPCR)**

A expressão dos genes N-RAS (homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma) e B-RAF (homólogo B do oncogene viral de sarcoma de murino v-raf) foi quantificada pelo método de PCR quantitativo (qPCR), utilizando o GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), como gene de referência, e o conjunto *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific®), conforme indicações do fabricante. O ensaio foi realizado em termociclador ABI 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), nas seguintes condições: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s (desnaturação) e 60 °C por um min (anelamento e extensão). Para todos os experimentos, o limiar de fase denominado de *Cycle threshold* (Ct) foi determinado automaticamente pelo software.

O cálculo para a determinação da expressão gênica foi o do  $\Delta\Delta Ct$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), que utiliza a expressão  $QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , na qual QR representa o nível de expressão gênica, Ct o ciclo de amplificação de cada amostra,  $\Delta Ct$  se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene controle e o  $\Delta\Delta Ct$  representa a diferença entre o  $\Delta Ct$  da amostra de interesse e o  $\Delta Ct$  da amostra de referência.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA MORTE POR APOPTOSE

Para avaliar a apoptose, foi utilizada a técnica conforme descrito por Vermes *et al.* (1995), com algumas alterações. As células ( $3 \times 10^5$  células/poço) foram transferidas para placas de 12 poços e incubadas por 24 h com a  $CC_{50}$  dos sais. Posteriormente, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS (1x). Após, o PBS foi removido, as células foram homogeneizadas em tampão de ligação (1x) e marcadas com Anexina-V-FITC por 15 min. Em seguida, foi adicionado o iodeto de propídio (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para realizar a leitura em citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences). As populações de células em cada quadrante foram determinadas utilizando o programa Flowing (2.5) e consideradas conforme a seguir:

- Células viáveis (anexina negativa e IP negativo)
- Células em apoptose (anexina positiva e IP negativo)
- Células em necrose (anexina negativa e IP positivo)
- Células com dupla marcação (anexina positiva e IP positivo)

#### 4.8 ANÁLISE DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA

Para analisar o ciclo celular e a fragmentação de DNA após os tratamentos com os sais, procedeu-se conforme o método descrito por Riccardi e Nicoletti (2006), com adaptações. As células ( $3 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas com os sais ( $CC_{50}$ ), em placas de 12 poços. Após 24 h, as células foram transferidas para tubos tipo *ependorf* e centrifugadas com PBS (1x). Em seguida foi adicionado etanol gelado 70% e incubado por 30 min a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Decorrido esse período, foi adicionado PBS contendo BSA (2%) e centrifugado por 10 min. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se uma solução de PBS contendo RNase (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 0,1% Triton, que foram transferidos para tubos especiais de citometria. No momento da análise, adicionou-se 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IP. A análise foi realizada em um citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences) e a população de células em cada fase do ciclo celular e o DNA fragmentado foi determinado pelo programa WinMDI 2.9.

#### 4.9 FOTOMICROGRAFIA DAS CÉLULAS – AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E CITOTOXICIDADE

As células ( $3 \times 10^5$  células/poço) foram transferidas para uma placa de 12 poços. Após 24 h de tratamento com os compostos, observou-se alterações morfológicas causadas pelos compostos. As imagens foram obtidas com aumento de 200 e 400x em microscópio de luz. Para cada sal utilizou-se a  $CC_{50}$  e também uma concentração inferior para comparações morfológicas.

#### 4.10 MIGRAÇÃO CELULAR – ENSAIO DE FECHAMENTO DE FENDA EM MONOCAMADA

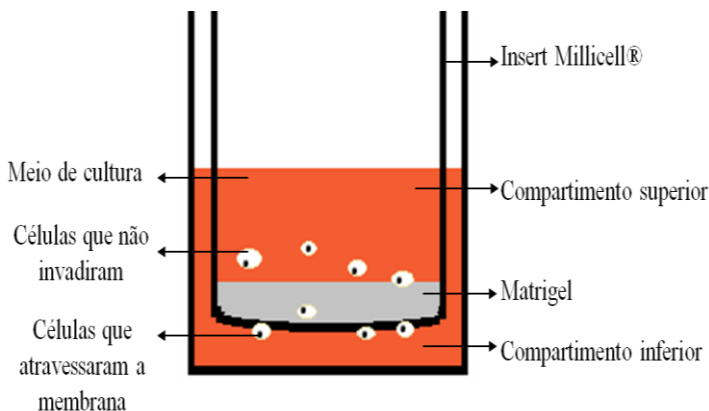
Para este ensaio,  $3 \times 10^5$  células/poço foram transferidas para placas de 12 poços até atingirem aproximadamente 90% de confluência. Em seguida, fez-se uma fenda em monocamada, com auxílio de uma ponteira estéril de 100  $\mu$ L. O meio foi retirado e as  $CC_{50}$  dos compostos foram adicionadas. Pontos de referência foram demarcados no fundo da placa a fim de permitir a obtenção de fotomicrografias das mesmas regiões. A migração celular foi avaliada pela distância da área livre de células. Essa medida foi realizada com o auxílio do programa *Image J*, sendo que a diminuição percentual da área caracterizou o índice de migração celular (CORY, 2011).

#### 4.11 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR

Para realização do ensaio de invasão celular foram utilizados *inserts* Millicell® com filtros de policarbonato de 12 mm e poros de 8  $\mu$ m. Cada filtro foi recoberto com 60  $\mu$ L de Matrigel® (extrato de proteínas da membrana basal) diluído (1:10) em meio (DMEM) gelado. O Matrigel® foi polimerizado, em estufa a 37°C, por 30 min. Na parte superior do *insert*, em cima do gel, foram adicionadas  $6 \times 10^4$  células em meio de cultura. Ainda nesse compartimento, adicionou-se o tratamento com os sais, sendo que a concentração utilizada foi metade da  $CC_{50}$ . Na parte inferior do *insert*, também foi adicionado meio de cultura. A placa foi incubada por 48 h, em estufa, a 37 °C. As células que permaneceram no compartimento superior dos *inserts* foram removidas com auxílio de uma haste flexível com algodão. As células que migraram para parte

inferior da membrana foram fixadas com glutaraldeído 5%, por 10 min e coradas com cristal violeta 0,5% por 15 min. As membranas foram lavadas com água destilada, para remoção do excesso de corante. Depois foram secas em temperatura ambiente, durante 24 h. Após esse período, os *inserts* foram colocados em uma lâmina de vidro, para visualização e aquisição das imagens no aumento de 100x. Com auxílio do programa *Image J*, foi realizada a contagem das células em 10 campos de visualização. Com isso, foi calculada a porcentagem de células que invadiram o Matrigel® e atravessaram a membrana. Na Figura 8, pode-se compreender a montagem experimental do ensaio de invasão celular.

**Figura 8. Montagem experimental do ensaio de invasão celular.**



Fonte: Desenvolvido pelo autor

#### 4.12 ÍNDICE COMBINATÓRIO

Primeiramente foi definida a  $CC_{50}$  dos sais MF01, MF02, MF03 e do vemurafenibe (PLX4032), no tempo de 72 h, pelo método MTT descrito acima. Para combinação dos sais com o vemurafenibe, foram escolhidas duas concentrações em que a viabilidade celular fosse igual ou superior a 80%. Para avaliar o efeito dessa combinação (sais x vemurafenibe) e determinar a presença de sinergismo, antagonismo ou efeito aditivo, foi utilizado o programa CompuSyn (versão 1.0) (CHOU

e TALALAY, 1984; CHOU, 2010). Uma vez compilados os dados, o programa define o valor do índice combinatório (IC), que pode ser visualizado no Quadro 5. Sendo o IC inferior a 0,90 considerado efeito sinérgico, valores entre 0,9 - 1,10, efeito aditivo e o índice superior a 1,10 considerado efeito antagônico.

**Quadro 5 - Valores do Índice Combinatório (IC) e descrição:**

Índice Combinatório (IC)	Descrição
<0,1	Sinergismo muito forte
0,1-0,3	Sinergismo forte
0,3-0,7	Sinergismo
0,7-0,85	Sinergismo moderado
0,85-0,90	Sinergismo fraco
0,90-1,10	Efeito aditivo
1,10-1,20	Antagonismo fraco
1,20-1,45	Antagonismo moderado
1,45-3,3	Antagonismo
3,3-10	Antagonismo forte
>10	Antagonismo muito forte

Fontes: Chou e Talalay (1984); Chou (2008).

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata, repetidos pelo menos três vezes, em dias diferentes.

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão e analisados estatisticamente, por meio do programa Graphpad Prism®, utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Dunnett para comparação com o grupo controle. Um valor de probabilidade menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerado estatisticamente significativo.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizamos o ensaio de viabilidade celular (MTT) para avaliar o efeito dos sais MF01, MF02, MF03, MF12, MF14 e MF15 em 24 h de incubação, diante das linhagens celulares. Como podemos observar na Tabela 1, a  $CC_{50}$  foi determinada para possível comparação da citotoxicidade celular entre os compostos e também com uma linhagem não tumoral (NGM). Essa concentração também foi definida como parâmetro para utilização em outros experimentos.

Os sais de isotiourônio MF01, MF02 e MF03 foram os que apresentaram as melhores  $CC_{50}$  em todas as linhagens tumorais estudadas, com concentrações entre 7 a 28  $\mu\text{M}$ . Os sais MF01 e MF03 resultaram em efeitos citotóxicos similares, principalmente nas linhagens de melanoma humano (SK-MEL). Isso sugere que a incorporação de um átomo de cloro (Cl) em posição orto do anel benzeno não alterou, de forma expressiva, o efeito nessas linhagens de melanoma. Porém, na linhagem não tumoral (NGM), o MF03 ( $CC_{50}$  45  $\mu\text{M}$ ) foi mais ativo do que o MF01 ( $CC_{50}$  88  $\mu\text{M}$ ). Isso sugere que, para essa linhagem não tumoral, o cloro (Cl) possa ter influenciado na atividade. O composto MF02 foi o que conseguiu causar 50% de morte celular com concentrações mais baixas em todas as linhagens de melanoma, entre 7 e 17  $\mu\text{M}$  (Tabela 1). No entanto, esse sal também foi citotóxico para linhagem não tumoral. A citotoxicidade do composto MF02 pode ocorrer devido à presença do grupo naftil na estrutura, o que aumenta a lipofilicidade, podendo melhorar a penetração do MF02 por meio da membrana celular, em ambas as células.

O sal *N*-fenilisotiourônio, MF12, e os sais de isotiossemicarbazidas, MF14 e MF15, apresentaram as  $CC_{50}$ s mais altas, entre 53 e 266  $\mu\text{M}$ , para as linhagens de melanoma. Comparando-se o MF12 com o MF15, observa-se que o grupo fenil ligado na amina do composto MF12 pode facilitar a atividade, como também estar relacionado com a lipofilicidade. O sal MF15 foi o que apresentou a atividade menos expressiva de todos os sais. Isso sugere que o grupo doador de elétrons (metoxila) em MF15 parece diminuir a atividade, já que o composto MF14 apresenta um grupo retirador de elétrons (nitro) e causou maior citotoxicidade. A inserção de uma amina secundária (NH) nos sais MF12, MF14 e

MF15 também pode estar relacionada com a diminuição do efeito citotóxico.

As linhagens de melanoma humano SK-MEL-19, -28 e -147 utilizadas neste trabalho possuem mutações que são frequentemente encontradas em pacientes com melanoma maligno. A linhagem SK-MEL-19 é mutada em BRAF<sup>V599E</sup>, a SK-MEL-28 é mutada em BRAF<sup>V600E</sup> e a linhagem SK-MEL-147 apresenta mutação em N-RAS<sup>Q61R</sup> (DAVIES *et al.*, 2002; LEE, CHOI e KIM, 2011).

Mutações em B-RAF estão presentes em aproximadamente 50 a 70% dos pacientes com melanoma, e a N-RAS é mutada entre 15 a 30% dos casos de melanoma (DAVIES *et al.*, 2002; GRAY-SCHOPFER, WELLBROCK e MARAIS, 2007). Dessas mutações, as mais frequentes são Q61R (N-RAS) e V600E (B-RAF), como demonstrado no estudo de Bucheit *et al.* (2013) em que dos 136 pacientes — com melanoma e com mutação em N-RAS — 82% tiveram mutação no éxon 2 (códon 60 e 61). E para mutação em B-RAF, 76% dos pacientes tinham mutação V600E. Contudo, a linhagem B16-F10, apesar de ser uma linhagem murina, é muito resistente e amplamente utilizada em modelos experimentais para estudos do processo metastático *in vivo* (ORTEGA *et al.*, 2008).

No Tabela 1 também está mostrado que os compostos, em sua maioria, foram mais citotóxicos para a linhagem SK-MEL-147 (N-RAS<sup>Q61R</sup>) sendo as CC<sub>50</sub> de 7, 9 e 10 µM para os compostos MF02, MF01 e MF03, respectivamente. Esses resultados são interessantes uma vez que essa linhagem celular é muito agressiva e quimiorresistente, expressando altos níveis de fatores antiapoptóticos (SOENGAS *et al.*, 2001; BROHEM *et al.*, 2009).

**Tabela 1 - Concentração do composto que causa 50% de morte celular (CC<sub>50</sub>) definida pelo método de MTT durante 24 h de tratamento com os compostos.**

		CC <sub>50</sub> (µM)			
Sais	Não tumoral	Tumoral			
	NGM	B16-F10	SK-MEL-19	SK-MEL-28	SK-MEL-147
MF01	88±5,7	20±0,7	25±2,3	15±1,9	9±2,4
MF02	20±0,9	17±2,4	12±1,7	12±0,7	7±2,8
MF03	45±13,6	28±1,8	26±0,7	17±0,5	10±2,7
MF12	158±23,5	72±1,8	76±14,1	64±10,7	53±3,0
MF14	171±20,3	87±0,5	77±0,6	68±9,5	86±0,6
MF15	316±23,9	167±0,2	266±8,1	140±0,7	202±4,1

**Dados foram expressos como média ± desvio padrão (n=3)**

A linhagem não tumoral selecionada para comparação da citotoxicidade com as tumorais foi a de melanócito humano (NGM), derivada de nevos benignos. A escolha dessa linhagem se deve, principalmente, pela semelhança que apresenta com as linhagens de melanoma, uma vez que os melanócitos são as células que dão origem a este câncer. Uma analogia com essa linhagem (NGM) também já foi mencionada em outro estudo (NIERO e MACHADO-SANTELLI, 2013).

Essa relação com uma linhagem não tumoral é necessária para melhorar o direcionamento dos fármacos, pois, atualmente, a maioria dos quimioterápicos também agride as células saudáveis, que resulta em efeitos colaterais graves, tais como mielossupressão, toxicidade renal, alopecia, náuseas, entre outros (BAI *et al.*, 2009; ROSEN *et al.*, 2013). Neste trabalho, todos os compostos resultaram em efeitos mais tóxicos para as linhagens tumorais do que para a linhagem não tumoral (NGM), após 24 h de tratamento.

O fato de os sais se apresentarem efeitos menos tóxicos para a linhagem NGM é uma característica importante de novos compostos, que frequentemente favorece a eficácia do tratamento, privilegiando células não tumorais a tumorais.

A comparação entre essas células resultou em um índice de seletividade (IS) que pode ser visualizado na Tabela 2. O IS corresponde à  $CC_{50}$  da linhagem não tumoral (NGM) dividido pela  $CC_{50}$  da linhagem tumoral. Quanto mais alto o índice, maior é a toxicidade do composto para as células tumorais. Exemplificando, IS igual a 1 (um) indica que o efeito citotóxico é igual para ambas as linhagens. Porém, um índice igual a 1,5 sugere que as células tumorais são 50% mais sensíveis ao composto do que as não tumorais. Obviamente, as substâncias mais desejadas deveriam ter um IS maior que 1 (um) (POPIOLKIEWICZ *et al.*, 2005). No entanto, alguns autores só consideram isso interessante quando os IS forem superiores a 3 (três), o que indica alta seletividade do composto (BÉZIVIN *et al.*, 2003; PRAYONG, BARUSRUX e WEERAPREEYAKUL, 2008).

Em estudo realizado por Brandão *et al.* (2013), os autores utilizaram compostos derivados de líquens e encontraram IS entre 1 a 4 para a linhagem celular B16-F10 quando comparada a uma linhagem de fibroblasto (NIH-3T3).

No presente estudo, também foi encontrado um índice entre 1 a 4 para a linhagem B16-F10. Entretanto, o composto MF01 foi o único que resultou em IS maior que 3 em todas as linhagens de melanoma, merecendo destaque os índices de 9,7 e 7,3 nas linhagens SK-MEL-147 e SK-MEL-28 respectivamente (Tabela 2). Essa diferença na atividade, indicada pelos valores de IS, pode ser devido às diferenças entre os alvos de ação dos compostos nas células tumorais e não tumorais (BRANDÃO *et al.* 2013).

Foi relatado um aumento de fosfolípidios nas células neoplásicas quando comparada com células não tumorais. Esse aumento pode variar dependendo da célula, fase de crescimento celular e malignidade (SZACHOWICZ-PETELSKA *et al.* 2010). Neste sentido, a maior citotoxicidade dos sais para as linhagens tumorais e os diferentes IS encontrados, podem estar relacionados com as diferentes características celulares, como a composição das membranas.

Baseado nos IS dos compostos MF01 e MF03 para as células SK-MEL-147 e -28, esses compostos foram selecionados para dar prosseguimento a este trabalho. O composto MF02 também foi incluído na maioria dos ensaios para possíveis comparações, também por apresentar a mais baixa  $CC_{50}$  com um IS próximo a 3 (três), na linhagem SK-MEL-147.

**Tabela 2 - Índice de Seletividade (IS) definido por meio da razão entre a  $CC_{50}$  da linhagem não tumoral e a  $CC_{50}$  da linhagem tumoral**

Compostos	Índice de Seletividade (IS)			
	Não tumoral/tumoral			
	NGM/B16-F10	NGM/-19	SK-MEL	
NGM/-28			NGM/-147	
MF01	4,4	3,6	7,3	9,7
MF02	1,2	1,7	1,7	2,8
MF03	1,6	1,7	2,6	4,5
MF12	2,2	2	2,5	3
MF14	2	2,2	2,5	2
MF15	1,9	1,2	2,3	1,6

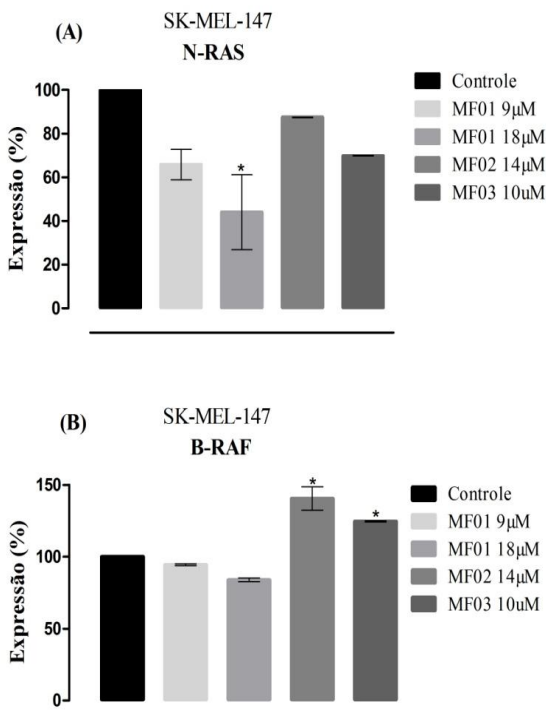
Para verificar se esse efeito citotóxico dos sais MF01, MF02, MF03 estava envolvido com alguma alteração na via das MAPK, foi utilizada a técnica de PCR quantitativo para verificar a expressão dos genes N-RAS e B-RAF, na linhagem SK-MEL-147.

Para obter-se este resultado, primeiramente foi analisada a melhor temperatura de anelamento dos *primers* por meio da técnica de PCR convencional (RT-PCR). Após observar uma banda mais expressiva na temperatura de 57°C (Apêndice A), foi realizada uma curva de eficiência para cada gene estudado

(Apêndice B). A eficiência de amplificação dos *primers* foi calculada individualmente a partir do logaritmo (Log) das diluições de cDNA, para cada um dos genótipos. Todos os *primers* em estudo apresentaram uma eficiência entre 90 a 97% (Apêndice C), ficando dentro dos valores preconizados (90 a 110%).

Na Figura 9, está representada a porcentagem de expressão de cada gene-alvo em relação às células-controle (considerado 100%), utilizando como gene de referência o GAPDH.

**Figura 9. Efeito dos sais MF01, MF02 e MF03 na expressão dos genes N-RAS e B-RAF por PCR quantitativo.**



As células, SK-MEL-147, foram incubadas com os sais durante 4 h. A avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR quantitativo, utilizando GAPDH como gene de referência. (A) expressão do gene N-

**RAS e (B) expressão do gene B-RAF. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. Valores de  $*p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao controle sem tratamento.**

A incubação dos compostos MF02 e MF03 com a linhagem SK-MEL-147 resultou em uma tendência na diminuição da expressão do gene N-RAS, já o sal MF01, na concentração de 18  $\mu\text{M}$ , reduziu de forma significativa a expressão de N-RAS. Além disso, o tratamento com o composto MF01 provocou uma diminuição, porém não significativa, da expressão de B-RAF, já os sais MF02 e MF03 aumentaram a expressão deste gene, sugerindo que esta via possa ainda estar ativada.

Mutações frequentes em melanoma, como N-RAS e B-RAF, provocam a ativação constitutiva da via das MAPK, como também na via PI3K/AKT, resultando em proliferação descontrolada e sobrevivência celular (HOCKER, SINGH e TSAO, 2008). Conforme o estudo de Jansen, *et al.* (1997), a N-RAS mutada pode contribuir para o bloqueio da apoptose. Esse grupo também sugere que a utilização de agentes que alterem a expressão do gene RAS ou interfiram no seu funcionamento seria uma interessante estratégia contra o câncer.

Conforme os resultados obtidos neste trabalho, a diminuição da expressão de N-RAS pelo sal MF01, em células da linhagem que apresenta esta proteína ativada, é interessante, pois esta propriedade pode ser utilizada para controlar a proliferação e a sobrevivência das células de melanoma. Apesar de não se saber exatamente o alvo ou os alvos moleculares deste composto, sugere-se as hipóteses a seguir:

1. Quando a RAS está ativada, pode estimular a via PI3K/AKT e RAF cinases (KELLEHER e MCARTHUR, 2012). Como o MF01 diminuiu a expressão de N-RAS e não alterou de forma expressiva a B-RAF, sugere-se que o efeito seja mais acentuado na via PI3K/AKT. A inibição dessa via pode resultar em diminuição da migração, proliferação, sobrevivência e induzir apoptose pela ativação de proteínas pró-apoptóticas, como a BAD, inativação de Bcl-xL e estimulação da caspase-9 (SOENGAS e LOWE, 2003). Sendo assim, torna-se interessante identificar se os compostos aumentam a quantidade de células em apoptose, o que

pode ter relação com a diminuição da expressão de N-RAS via PI3K/AKT.

2. Essa diminuição da expressão de N-RAS, provocada pelo MF01, também pode influenciar a atividade do NF- $\kappa$ B. Como a via PI3K/AKT, o NF- $\kappa$ B pode ser ativado em resposta à ativação constitutiva de RAS e pode promover a expressão de proteínas antiapoptóticas (JONESON e BAR-SAGI, 1999). Numerosas moléculas, incluindo AKT e NF- $\kappa$ B, em diferentes vias de sinalização, podem ativar o melanoma e o composto MF01, alterando a expressão de N-RAS, o que pode diminuir essa ativação. No entanto, esta hipótese necessita de mais dados para ser comprovada.

Ainda, como já mencionado, o melanoma é bem conhecido pela resistência à quimioterapia. Quanto a este aspecto, tem sido relatado, que a causa é, em parte, devido a defeitos na sinalização da apoptose. Mutações em alguns genes envolvidos no mecanismo de apoptose estão relacionados com o mecanismo de resistência do melanoma, entre eles o oncogene N-RAS (SOENGAS e LOWE, 2003; EBERLE *et al.*, 2007). Neste sentido, moléculas que possam interferir com este oncogene poderiam tornar-se potenciais fármacos ou moléculas modelo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para os melanomas resistentes e que apresentem esta mutação.

Para verificar se os compostos (MF01, MF02, MF03, MF12, MF14 e MF15) induziam morte por apoptose na linhagem SK-MEL-147, foi utilizada marcação com iodeto de propídio (IP) e o conjugado Anexina-V-FITC. As células em processo de apoptose passam por mudanças na bicamada fosfolipídica da membrana celular e ocorre externalização da fosfatidilserina para membrana externa. Assim, células apoptóticas podem ser marcadas com Anexina-V (proteína que possui afinidade pela fosfatidilserina), ligada ao fluorocromo FITC, enquanto que o IP é barrado, pois este só consegue penetrar nas células quando sua membrana não está íntegra, como ocorre na necrose (KRYSKO *et al.*, 2008).

Nos gráficos da Figura 10, observa-se que, em relação ao controle, os compostos aumentam a quantidade de células em apoptose (quadrante inferior direito). Na quantificação desses resultados (Figura 11), também foi observado esse perfil de morte celular. O composto MF01, com 9  $\mu$ M, isto é, com a CC<sub>50</sub> para a linhagem testada, aumentou de forma significativa a quantidade de

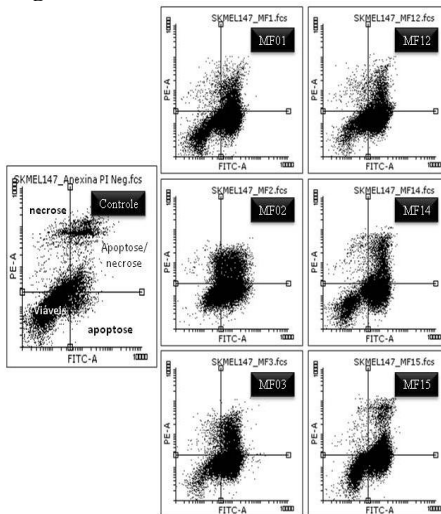


células em apoptose, aproximadamente 35% delas. Nenhum dos compostos testados aumentou a quantidade de células em necrose (quadrante superior esquerdo).

Um aumento do número de células em apoptose também foi observado no estudo de Koronkiewicz, *et al.* (2012) em que o composto, brometo de N, N'-Diisopropil-S-(2,3,4,5,6-pentabromobenzil) isotiourônio, derivado de tioureia, aumentou em 66% o número de células em apoptose.

Conforme demonstrado anteriormente, o composto MF01 diminuiu a expressão de N-RAS e isso pode estar relacionado com o aumento da quantidade de células em apoptose. Semelhante a esse resultado, no estudo de Eskandarpour *et al.* (2005) foi demonstrado que a supressão do oncogene N-RAS induziu apoptose em duas linhagens de melanoma humano, sugerindo que esse oncogene é fundamental para resistência à apoptose em melanoma. Dados estes que corroboram, pelo menos em parte, com uma de nossas hipóteses mencionadas acima.

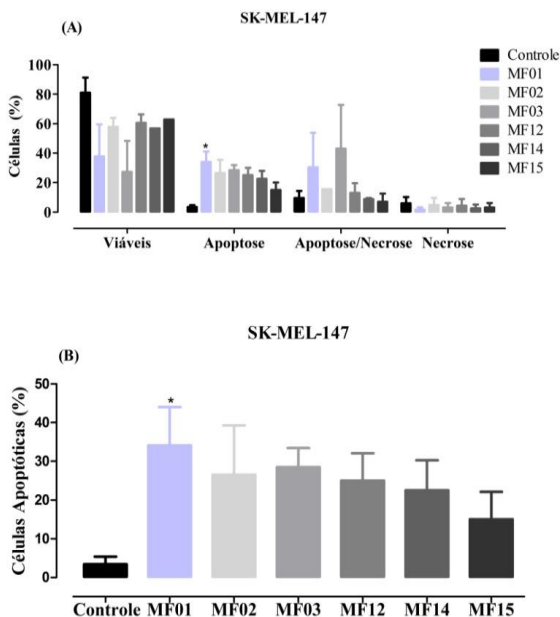
**Figura 10. Avaliação da morte celular por apoptose induzida pelos sais na linhagem SK-MEL-147.**



As células foram tratadas com  $CC_{50}$  dos compostos por 24 h e o controle representa as células sem tratamento. A apoptose foi determinada pela análise da marcação com Anexina-V-FITC e a necrose, pela marcação com IP. Os gráficos (*dot plots*) representam um dos experimentos

realizados. As populações de células em cada quadrante foram determinadas utilizando o programa Flowing (2.5). O quadrante inferior esquerdo representa as células viáveis, o quadrante inferior direito representa as células em apoptose, o canto superior esquerdo representa as células em necrose e o canto superior direito as células duplamente marcadas.

Figura 11. Quantificação do tipo de morte celular induzida pelos sais na linhagem SK-MEL-147.



As células foram tratadas com  $CC_{50}$  dos compostos por 24 h, e o controle representa as células sem tratamento. A apoptose foi determinada pela análise da marcação com Anexina-V-FITC e a necrose pela marcação com IP. A Figura 11 (A) representa a porcentagem de células viáveis, em apoptose, em necrose e duplamente marcadas (apoptose/necrose). A Figura 11 (B) demonstra, em maior aumento, apenas as células em apoptose. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de  $*p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o mesmo grupo de células controle.

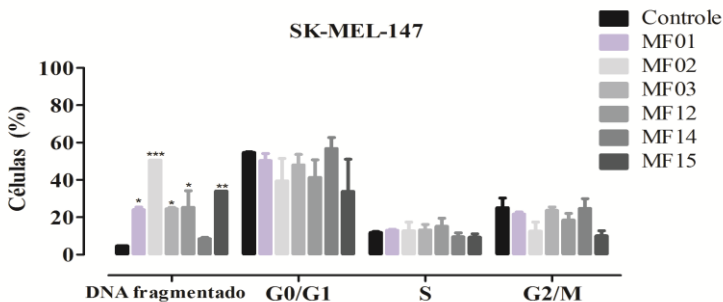
Como mostrado por Soengas *et al.* (2001), a linhagem SK-MEL-147 expressa baixos níveis de Apaf-1 e altos níveis de fatores antiapoptóticos, tais como Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1. No estudo de Alla *et al.* (2010), foi caracterizado que a SK-MEL-147 é uma linhagem com alto potencial invasivo e metastático, que apresenta altos níveis de E2F1, diferentemente da linhagem SK-MEL-19, que não expressou este gene. A superexpressão de E2F1 é associada ao rápido crescimento do tumor e à baixa sobrevida dos pacientes. A desregulação de E2F1 está diretamente relacionada com invasão e metástase das células de melanoma maligno. A E2F1 pode também facilitar a metástase bloqueando funções pró-apoptóticas (ALLA *et al.*, 2010). Apesar da linhagem SK-MEL-147 ser resistente, os sais em estudo parecem contornar esta barreira, conseguindo aumentar a morte celular por apoptose.

Outra forma para distinguir a morte por apoptose são ensaios que identificam a presença de fragmentação de DNA por meio de citometria de fluxo (OKADA e MAK, 2004). Células apoptóticas, entre outras características típicas, são caracterizadas pela fragmentação de DNA e, conseqüentemente, perda do conteúdo de DNA. A utilização de um fluorocromo, tal como o IP, que é capaz de ligar-se, marcando o DNA, torna possível a identificação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (RICCARDI e NICOLETTI, 2006).

Para avaliação da fragmentação de DNA, utilizamos o ensaio que também permite analisar as células em diferentes fases do ciclo celular. Para isso, as células foram incubadas, por 24 h, com as CC<sub>50</sub>s dos compostos, lisadas, fixadas, marcadas com IP e analisadas por citometria de fluxo. Analisando a Figura 12, destaca-se que os compostos (MF01, MF02, MF03, MF12 e MF15) induziram aumento na fragmentação de DNA (24 – 50%), dados que corroboram com os anteriormente apresentados e discutidos no ensaio com Anexina-V-FITC e IP.

A indução de apoptose é uma importante defesa contra o câncer e os resultados apresentados com os compostos favorecem a busca de novas terapias para o melanoma.

**Figura 12.** Efeito dos sais sobre a fragmentação de DNA e distribuição das células no ciclo celular na linhagem SK-MEL-147.



As células foram tratadas com a  $CC_{50}$  dos sais, por 24 h, e analisadas por citometria de fluxo. A distribuição no ciclo celular está representada pelas fases G0/G1, S e G2/M, e a porcentagem de células com DNA fragmentado está localizada à esquerda do gráfico. A quantificação das células foi realizada com auxílio do programa WinMDI 2.9. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. Valores de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o grupo controle em cada fase do ciclo celular.

A análise do ciclo celular em câncer possui importância para avaliar a resposta em fases específicas do ciclo, diante de determinados agentes terapêuticos (WILLIAMS e STOEBER, 2012). Esse tipo de análise fornece informações sobre a posição da célula nas fases do ciclo celular, conforme o conteúdo de DNA. Análise por citometria de fluxo é uma maneira rápida e precisa de se avaliar o conteúdo de DNA nas células, tornando-se, assim, um instrumento de escolha para esta avaliação (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2011). Neste sentido, optou-se por esta técnica para verificar a ação dos sais nas várias linhagens celulares estudadas.

Na Figura 12, observa-se que nenhum dos compostos foi capaz de provocar mudanças na progressão do ciclo celular. No Apêndice D estão os histogramas representativos de cada fase avaliada. Em relação ao controle, observa-se uma distribuição semelhante de células em cada fase do ciclo.

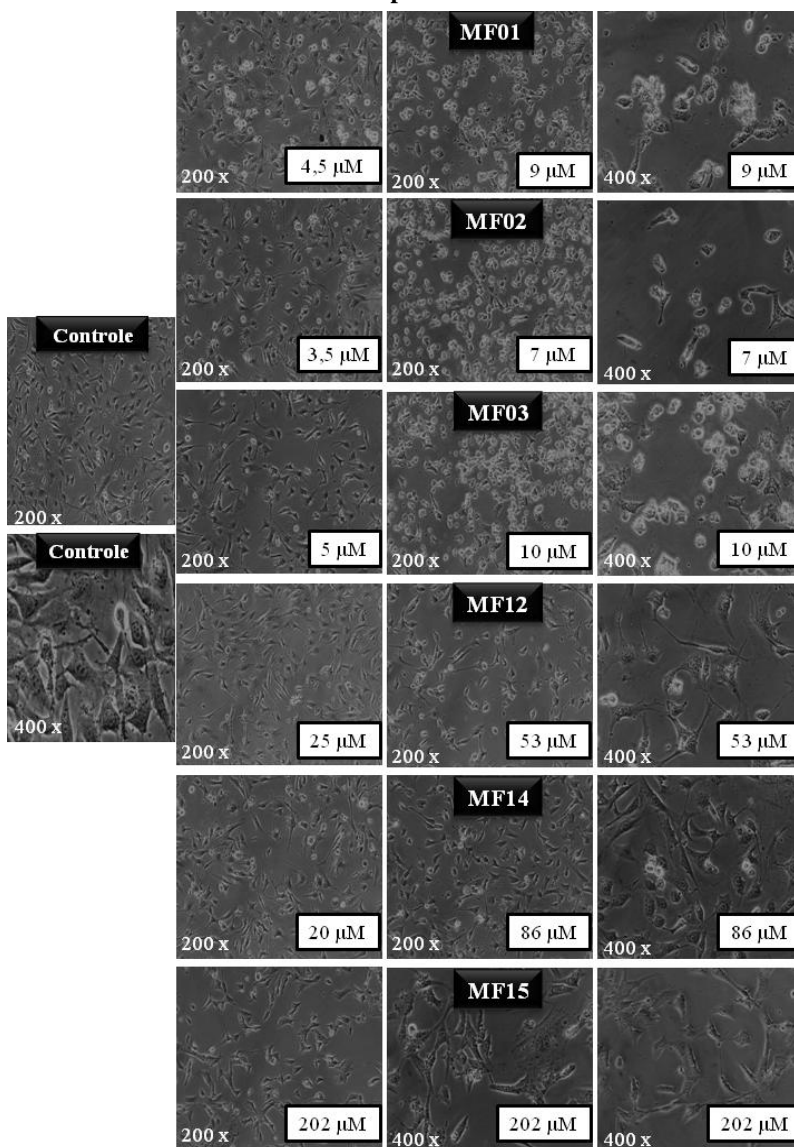
Diferentemente do nosso estudo, Segura *et al.* (2013) utilizaram inibidores da proteína prooncogênica BET e conseguiram promover uma parada no ciclo celular da linhagem SK-MEL-147 com um aumento na porcentagem de células na fase G1. Neste estudo, observou-se que as linhagens de melanoma apresentavam expressão aumentada de duas proteínas membros da família BET (BRD2 e BRD4). Além da parada do ciclo celular, inibidores da proteína BET, quando testados *in vivo*, reduziram o volume do tumor e metástases.

Os resultados do nosso estudo demonstram que, embora os compostos reduzam a viabilidade celular, o tratamento com os sais não foi capaz de influenciar na progressão do ciclo celular nas condições experimentais realizadas.

Na busca pela elucidação dos eventos que propiciaram a citotoxicidade dos sais, realizou-se uma avaliação da morfologia celular após tratamento com os compostos. Na Figura 13, estão demonstradas micrografias representativas das células após incubação por 24h com as CC<sub>50</sub>s e uma concentração mais baixa dos compostos. As fotos foram obtidas em um microscópio invertido de luz, com câmera acoplada resultando em aumentos de 200x e 400x. Nas células do grupo controle, observou-se uma monocamada contínua, com as células justapostas, núcleo grande e com extensos filamentos celulares característicos dessa linhagem. Quando as células foram tratadas com os compostos MF12, MF14 e MF15, não foram observadas diferenças morfológicas significativas. No entanto, quando as células foram tratadas com os compostos MF01, MF02 e MF03, principalmente com a CC<sub>50</sub>, observou-se alterações morfológicas, tais como: diminuição dos prolongamentos citoplasmáticos, núcleo disforme e células mais arredondadas. Também pode-se observar diminuição do número de células aderidas na placa e uma maior proliferação nas células do grupo controle. Estas observações sugerem um efeito antiproliferativo causado pelos compostos.

Esse efeito antiproliferativo, quando as células são tratadas com os sais MF01, MF02 e MF03, pode estar relacionado com a diminuição da expressão de N-RAS. Como comentado, a N-RAS faz parte da via das MAPK, que também está envolvida com a proliferação e a sobrevivência celular (WELLBROCK, KARASARIDES e MARAIS, 2004).

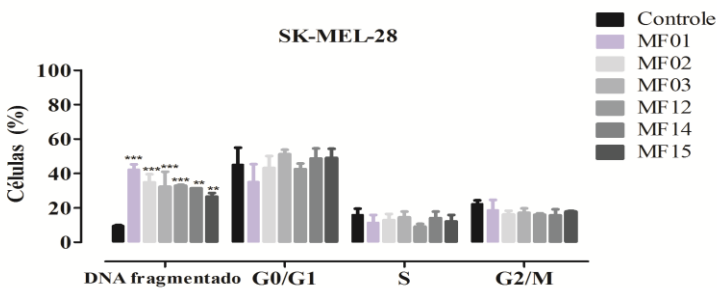
**Figura 13. Avaliação morfológica das células (SK-MEL-147) após incubação por 24 h com os compostos. As fotos foram tiradas no aumento de 200 e 400x em microscópio de luz.**



A análise do ciclo celular e a avaliação de células fragmentadas também foram realizadas com a linhagem SK-MEL-28. Como percebe-se na Figura 14, os compostos não induziram alterações nas fases do ciclo celular, quando se compara ao controle nestas condições. Os histogramas representativos dessa análise encontram-se no Apêndice E. No entanto, todos os compostos, quando tratados com a  $CC_{50}$  dos sais, aumentaram a porcentagem de células com fragmentação no DNA, o que é sugestivo de morte por apoptose. Ressalta-se que a fragmentação de DNA, neste ensaio, é apenas um indicativo de células apoptóticas (KAJSTURA *et al.*, 2007), sendo interessante relacionar com outro teste para confirmação. Como no estudo de Wang *et al.* (2014), que relacionaram o aumento de fragmentação de DNA (fase sub-G1) com o acréscimo de células marcadas com Anexina-V-FITC, consequentemente desencadeando expressão de caspase-3 em célula de melanoma. Outros estudos também relacionam o aumento de fragmentação de DNA com a diminuição de expressão de proteínas antiapoptóticas e o aumento de proteínas pró-apoptóticas (SUN *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2013).

O aumento de células apoptóticas torna-se interessante, uma vez que a modulação experimental de apoptose ou em fatores antiapoptóticos também influencia na eficiência metastática (MEHLEN e PUISIEUX, 2006).

**Figura 14. Efeito dos sais sobre a fragmentação de DNA e distribuição das células no ciclo celular na linhagem SK-MEL-28.**



As células foram tratadas com a  $CC_{50}$  dos sais, por 24 h e analisadas por citometria de fluxo. A distribuição no ciclo celular está representada pelas fases G0/G1, S e G2/M e a porcentagem de células com DNA fragmentado estão localizadas à esquerda do gráfico. A quantificação das células foi realizada com auxílio do programa

**WinMDI 2.9. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o grupo-controle em cada fase do ciclo celular.**

Estudos recentes sugerem que o oncogene B-RAF também está relacionado com a promoção de invasão e de metástase em melanoma. O oncogene B-RAF pode ativar o fator de transcrição BRN2, que ativa PDE5A, causando a diminuição da proliferação e estimulando a invasão e a metástase de células de melanoma (ARÓZARENA *et al.*, 2011). Mutações de B-RAF V600E e silenciamento do gene supressor tumoral *Pten* provocaram o desenvolvimento de melanoma com 100% de penetrância, e metástases observadas em linfonodos e pulmões (DANKORT *et al.*, 2009).

Baseando-se nestas informações conclui-se que seria interessante avaliar a capacidade antimetastática com ensaios *in vitro* que busquem verificar a inibição da migração e da invasão celular.

Dessa forma, o ensaio de migração celular, também conhecido como ensaio de fechamento de fenda ou *scratch* foi implementado, pois consiste em um método simples e econômico para este fim. Esse método é baseado na observação de que, após a criação de uma fenda em uma monocamada de células confluentes, as células mover-se-ão para o local vazio, até que o contato célula-célula seja estabelecido novamente. Os passos envolvem: a criação de uma fenda em monocamadas de células, a captura das imagens no início (tempo zero) e após 24 h, como também a comparação das imagens para determinar a taxa de migração celular. Uma vantagem deste método é que ele mimetiza a migração de células *in vivo* (LIANG, PARK e GUAN, 2007).

Assim, para o ensaio de migração celular, as células foram incubadas com as  $CC_{50}$ s dos sais durante 24 h. Após esse período, observou-se o fechamento da fenda, com o auxílio de um microscópio invertido de luz. Para esse experimento, utilizou-se a linhagem SK-MEL-28 mutação B-RAF<sup>V600E</sup>, e a linhagem murina que é muito utilizada em experimentos *in vivo*, a B16-F10.

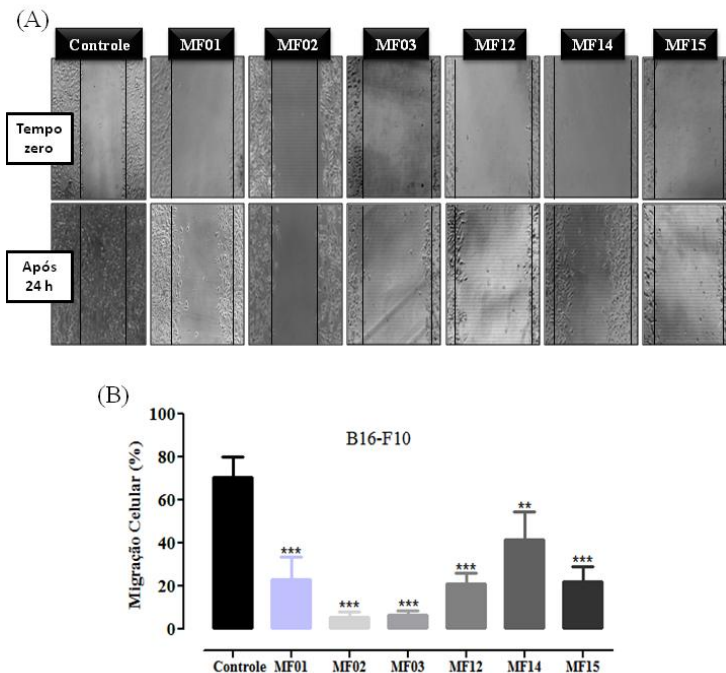


Como podemos observar na Figura 15 e Figura 16-A, todos os compostos impediram que as células migrassem para as áreas livres da fenda, no período de 24 h. Entretanto, as células do grupo controle migraram até atingirem a confluência. Quando a porcentagem de migração foi calculada (Figura 15 e Figura 16-B), observou-se que o resultado foi mais expressivo na linhagem B16-F10, em que todos os compostos impediram mais de 60% a migração celular. Para a linhagem SK-MEL-28, o composto MF01 foi o que apresentou os melhores resultados, com aproximadamente 70% de inibição. Apesar das concentrações dos sais provocarem 50% de morte celular, o fato de haver menos células migrando deve ser considerado, pois a inibição, na maioria dos casos, é superior a 50%.

A avaliação da capacidade migratória é muito utilizada em estudos que visam ao potencial antimetastático de novos compostos. No trabalho de Siripong, *et al.* (2012), avaliou-se o potencial antimigratório do extrato de uma planta que é utilizada tradicionalmente para tratamento de tumores, *Maclura amboinensis* B1 (MA), em células B16-F10, em 24 h de tratamento. Os extratos de MA, assim como os sais em estudo, inibiram expressivamente a migração das células B16-F10. Sendo que o extrato em *n*-hexano na concentração de 75 µg/mL inibiu a habilidade migratória em aproximadamente 70%. Nesse mesmo estudo utilizou-se como controle positivo, a doxorrubicina (um citostático antracíclico amplamente utilizado no tratamento de diferentes cânceres) que na dose de 20 µM inibiu a capacidade migratória. Os sais de isotiourônio (MF01, MF02, MF03) com concentrações (20, 17 e 28 µM, respectivamente) semelhantes a da doxorrubicina também inibiram a capacidade migratória (80-95%) da linhagem B16-F10 (Figura 15).

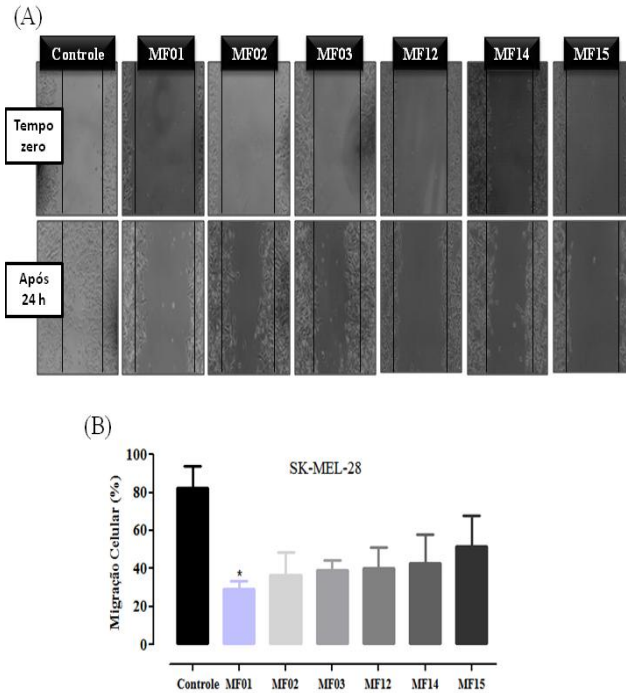
Foi constatado por Kuphal *et al.* (2009) que a linhagem SK-MEL-28 apresentou redução na expressão de H-caderina. As caderinas apresentam funções na adesão celular epitelial e a diminuição da expressão está associada ao aumento da capacidade migratória e invasiva de células tumorais. Apesar da SK-MEL-28 apresentar baixa expressão de H-caderina, a diminuição da migração das células SK-MEL-28, provocada principalmente pelo sal MF01, reflete, com mais esta evidência que esse composto é um bom candidato para novas pesquisas para o tratamento do melanoma metastático.

Figura 15. Migração celular, ensaio de fechamento de fenda em monocamada.



As células, B16-F10, foram plaqueadas e incubadas com os sais ( $CC_{50}$ ) durante 24 h. O fechamento da fenda foi avaliado após esse período. (A) Fotomicrografias no tempo zero e após 24 h de incubação com os sais. (B) Quantificação da migração celular. A medida foi realizada com o auxílio do programa *Image J*, sendo que a diminuição percentual da área caracterizou o índice de migração celular. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o mesmo grupo de células-controle.

**Figura 16. Migração celular, ensaio de fechamento de fenda em monocamada.**



As células SK-MEL-28 foram plaqueadas e incubadas com os sais ( $CC_{50}$ ) durante 24 h. O fechamento da fenda foi avaliado após esse período. (A) Fotomicrografias no tempo zero e após 24 h de incubação com os sais. (B) Quantificação da migração celular. A medida foi realizada com o auxílio do programa *Image J*, sendo que a diminuição percentual da área caracterizou o índice de migração celular. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de  $*p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o mesmo grupo de células-controle.

Para confirmar se a inibição da migração celular ocorria independentemente da citotoxicidade, foi realizado o ensaio de invasão celular com os sais MF01 e MF02.

A invasão celular é definida como uma penetração nas barreiras do tecido, passagem através da membrana basal e

infiltração em tecidos adjacentes. Diferentemente da migração, a invasão celular é o movimento através de uma matriz tridimensional (3D). A invasão requer adesão, proteólise de componentes da matriz extracelular e migração. Portanto, células invasoras remodelam a matriz (KRAMER *et al.*, 2013).

Um componente muito utilizado nos ensaios de invasão é o Matrigel®. Esse componente é um extrato de proteínas da membrana basal, que forma um gel 3D, a 37 °C, e suporta a morfogênese, a diferenciação celular e o crescimento do tumor. Os principais componentes do Matrigel® são proteínas estruturais, como a laminina, a entactina e o colágeno; fatores de crescimento e outras proteínas, em menor quantidade. Devido a essa composição, seu uso permite avaliar etapas primordiais para a invasividade celular (KLEINMAN e MARTIN, 2005).

Esse tipo de ensaio permite a realização dos estudos de potencial antimetastático de compostos que possam agir sobre a célula tumoral, alterando sua motilidade, sobre moléculas de adesão e metaloproteinases, o que o torna um ensaio mais coerente em relação ao processo de invasividade (KRAMER *et al.*, 2013).

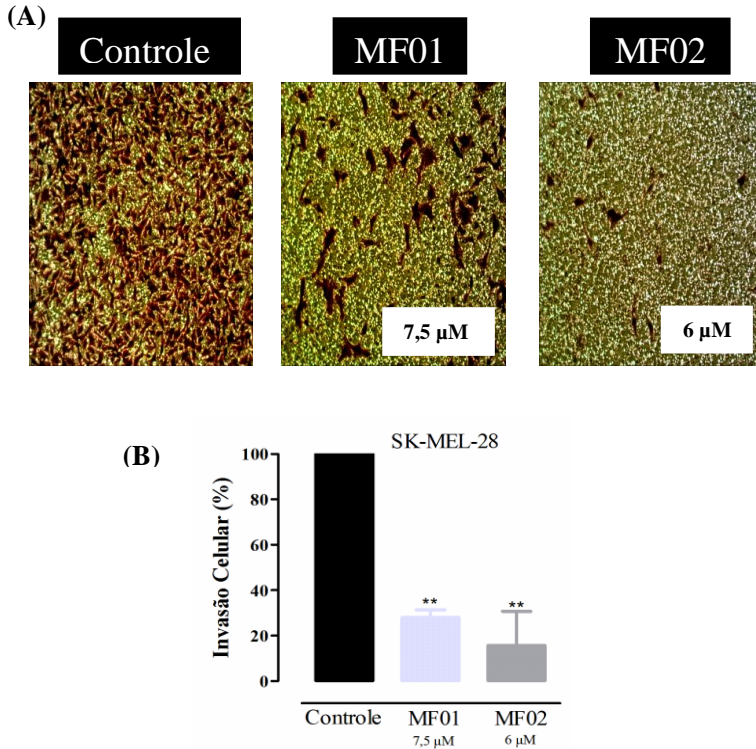
Para isso, avaliou-se a capacidade dos sais invadirem o Matrigel® atravessando uma membrana de 8 µm. As concentrações utilizadas foram inferiores a CC<sub>50</sub>. Com esta abordagem evitou-se que o efeito citotóxico interferisse na análise. Nessas concentrações (7,5 e 6 µM), a viabilidade celular foi de, aproximadamente, 70% (Apêndice F).

Na Figura 17-A, observa-se que os compostos MF01 e MF02 impediram que as células atravessassem o Matrigel®, diferentemente do controle, em que as células conseguiram invadir esta barreira facilmente. Quando esses resultados foram quantificados (Figura 17-B), observou-se que apenas 20% das células expostas aos compostos MF01 e MF02 foram capazes de atravessar a membrana. Esses resultados são expressivos e sugerem um potencial antimetastático desses sais. Porém, ainda não conhecemos que mecanismo os sais utilizam para alterar a invasividade da linhagem SK-MEL-28, *in vitro*.

Outros ensaios são interessantes para elucidar esse efeito, como no estudo de Cao *et al.* (2014), em que se relacionou a migração e invasão celular com diminuição da atividade de metaloproteinases 2 e 9, pela técnica de zimografia e redução da

fosforilação de STAT3, pois, quando aumentada, contribui para o desenvolvimento do melanoma.

**Figura 17. Efeito dos sais sobre o ensaio de Invasão Celular.**



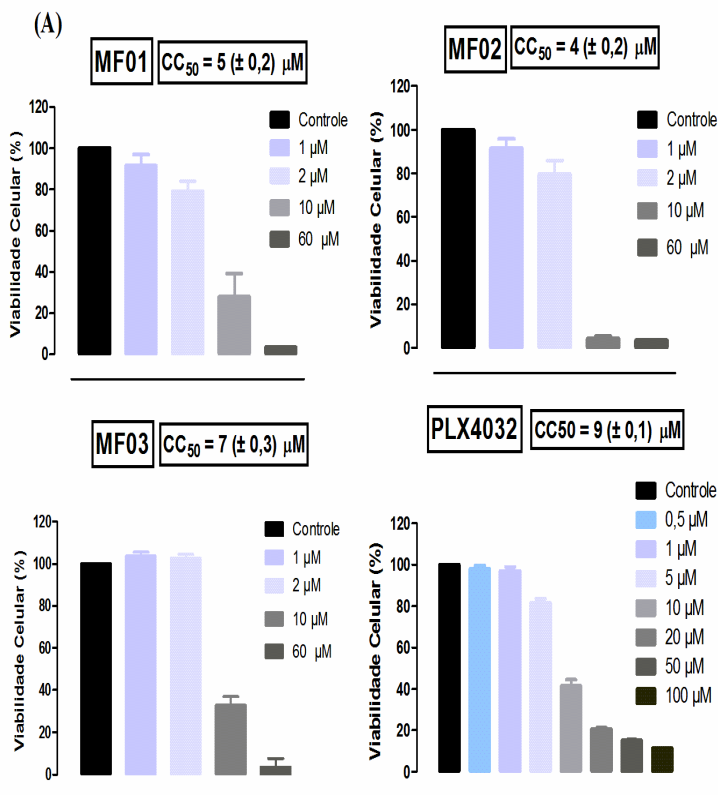
As células SK-MEL-28 foram incubadas com os sais por 48 h. Após esse período, as células que invadiram o Matrigel® e atravessaram a membrana foram coradas com cristal violeta para melhor visualização. (A) Células coradas após 48 h de incubação com os sais. O controle representa as células sem tratamento. As fotomicrografias no aumento de 100x representam dados de um experimento. (B) Quantificação das células que atravessaram a membrana com auxílio do programa *Image J*. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o mesmo grupo de células-controle.

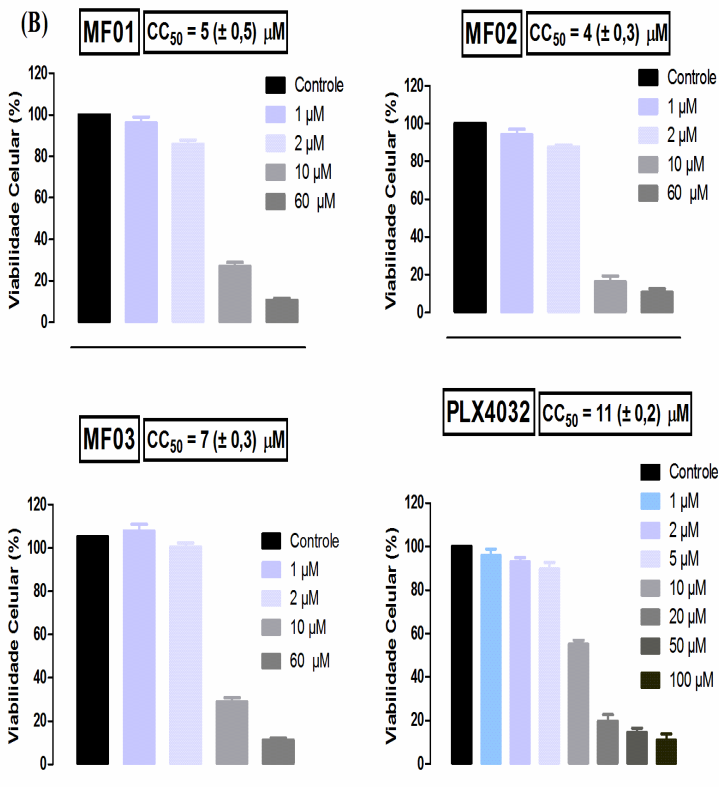
Neste trabalho, também comparou-se a citotoxicidade dos sais com um fármaco já aprovado pelo FDA para o tratamento do melanoma metastático, o vemurafenibe (PLX4032). Para isso, foi utilizado o ensaio de MTT, porém no tempo de 72 h, pois na literatura não se encontrou tempo de incubação com vemurafenibe inferior a este.

Como esperado, a  $CC_{50}$  dos sais, em 72 h de incubação, foi inferior do que aquelas obtidas em 24 h. Isso pode ser explicado pelo maior tempo de contato dos sais com as células, permitindo uma maior interação. Como se pode observar na Figura 18 (A e B), a  $CC_{50}$  dos sais foi igual para ambas as linhagens estudadas. Porém, em 24 h, observou-se uma maior citotoxicidade dos sais para a linhagem SK-MEL-147 (Tabela 1), provavelmente em função das propriedades físico-químicas dos compostos e da constituição da membrana citoplasmática desta linhagem, aspectos ainda não estudados.

Os sais MF01, MF02, MF03 foram mais citotóxicos para as células do que o PLX4032. A citotoxicidade do vemurafenibe (PLX4032) foi menor para a linhagem SK-MEL-28 (9  $\mu\text{M}$ ) do que para SK-MEL-147 (11  $\mu\text{M}$ ). Considerando-se que o vemurafenibe é um quimioterápico utilizado para pacientes que apresentam mutações em B-RAF V600E, isso justifica o efeito mais pronunciado na linhagem SK-MEL-28, ao qual apresenta essa mutação. Diferente dos resultados deste estudo, Niehr *et al.* (2011) encontraram uma  $CC_{50}$  de 1,5  $\mu\text{M}$ , quando incubada com o vemurafenibe, por 72 h, na linhagem SK-MEL-28 e  $CC_{50}$  superior a 20  $\mu\text{M}$  para outra linhagem com mutação em B-RAF<sup>V600E</sup>. Entretanto, Sondergaard *et al.* (2010) deixaram o vemurafenibe em contato com a SK-MEL-28, por 120 h. Isso resultou em uma  $CC_{50}$  de 4,6  $\mu\text{M}$ . Essa diferença, encontrada na citotoxicidade, pode estar relacionada com as mudanças de condições experimentais e também pela utilização de MTS [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-5-(3-carboximetóxfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio], ao invés do método de MTT. Apesar de serem métodos similares, a  $CC_{50}$  pode ser diferente com a utilização de outros ensaios para avaliar a viabilidade celular (Wang, Henning e Heber, 2010).

**Figura 18. Avaliação da viabilidade celular durante 72 h de incubação com os sais (MF01, MF02 e MF03) e com vemurafenibe (PLX4032).**





Para a avaliação foi utilizada a técnica de MTT. A  $CC_{50}$  foi também determinada para o composto PLX4032, em 72 h de tratamento. (A) Viabilidade das células SK-MEL-28 com os diferentes tratamentos. (B) Viabilidade das células SK-MEL-147 com os diferentes tratamentos.

A atividade clínica do vemurafenibe, em pacientes com melanoma metastático com mutação em B-RAF V600E, é limitada pelo rápido desenvolvimento de resistência e efeitos colaterais. Neste sentido, vários mecanismos de resistência têm sido propostos na literatura, tais como a reativação da via das MAPK, aumento da expressão de C-RAF (MONTAGUT *et al.*, 2008) e a ativação do oncogene N-RAS (RAMIN *et al.*, 2010).

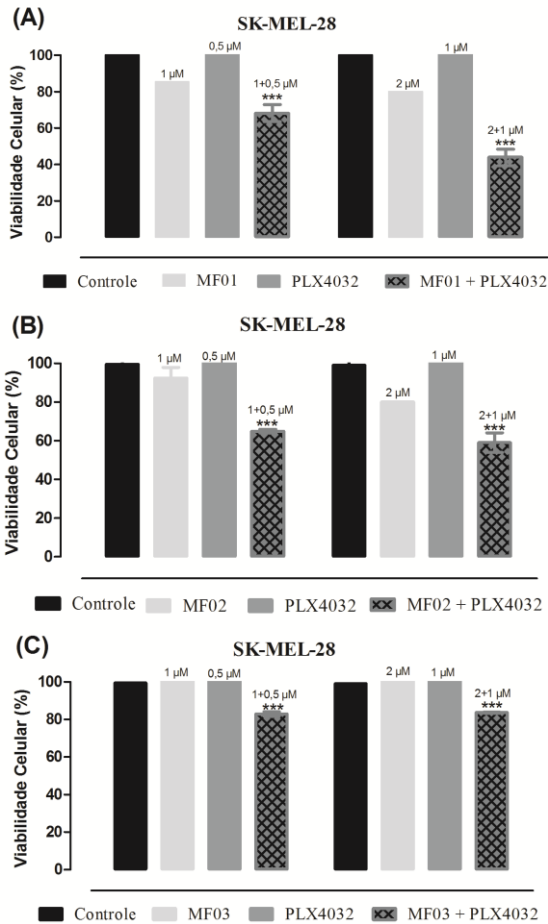


A combinação de fármacos é muito utilizada no tratamento de doenças como câncer e Aids. Os principais objetivos dessas associações são conseguir um efeito terapêutico sinérgico, redução da dose e toxicidade e minimizar ou adiar a indução de resistência (CHOU, 2006; PANNU *et al.*, 2011; FASSNACHT *et al.*, 2012).

Com o objetivo de melhorar a resposta do vemurafenibe, associaram-se os compostos MF01, MF02 e MF03 com esse fármaco, nas linhagens celulares SK-MEL-28 e SK-MEL-147. Para isso, foram escolhidas as concentrações com baixa citototoxicidade para os sais e para o vemurafenibe e verificou-se se esta associação resultaria em diminuição da viabilidade celular. As concentrações utilizadas para os sais foram 1  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$ , nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-147. Para o PLX4032 foram 0,5  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$  para a SK-MEL-28 e 1  $\mu\text{M}$  e 2  $\mu\text{M}$  para a SK-MEL-147. O método utilizado para verificar esse efeito foi o MTT e os compostos foram incubados no mesmo poço, em contato com as células, no período de 72 h.

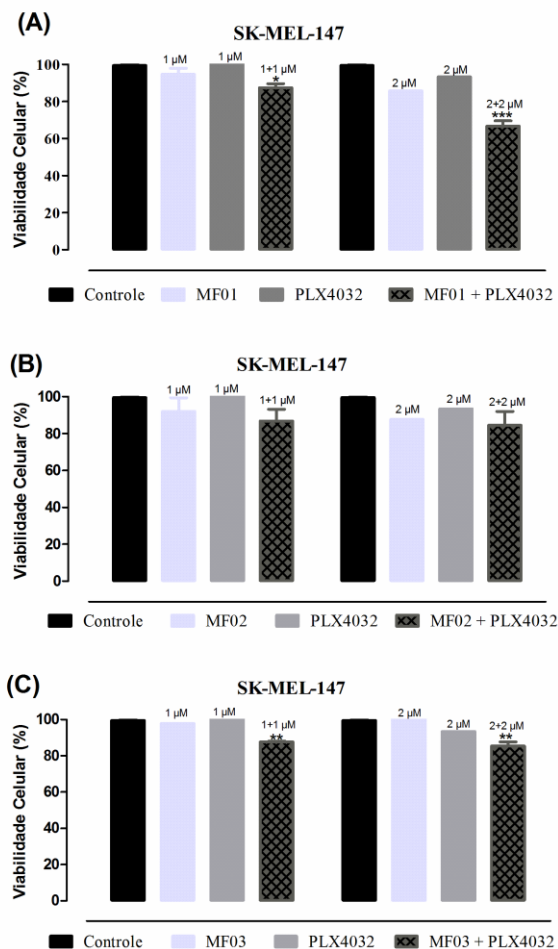
Como podemos observar na Figura 19 e na Figura 21, a combinação dos compostos resultou em forte diminuição da viabilidade celular. A associação foi mais eficiente para a SK-MEL-28, com aproximadamente 40% de diminuição da viabilidade celular. Na linhagem SK-MEL-147, o MF01 foi o que apresentou o melhor resultado. Como esperado, o PLX4032, inibidor da B-RAF<sup>V600E</sup>, diminuiu a viabilidade da linhagem SK-MEL 28 e os sais podem estar auxiliando no bloqueio de alguma proteína da via das MAPK ou outra proteína que possa auxiliar na diminuição da viabilidade celular. O composto MF01, na linhagem SK-MEL-147, como já mencionado, diminuiu a expressão de N-RAS, e esta associação com o PLX4032 (inibidor da B-RAF<sup>V600E</sup>) contribuiu para bloquear ainda mais esta via. Além de analisar a viabilidade celular dessa combinação, também se torna interessante elucidar o mecanismo de morte celular. Como no estudo de Wang, *et al.* (2013), em que associou-se um inibidor de tubulina com o vemurafenibe, foi observado uma parada no ciclo celular nas fases G1-G2, um aumento de apoptose, caspase-3 e redução da fosforilação da AKT em linhagens de melanoma humano.

**Figura 19.** Efeito da combinação dos compostos MF01 (A), MF02 (B), MF03 (C) e PLX4032 na viabilidade das células SK-MEL-28.



As células, SK-MEL-28, foram plaqueadas e incubadas, por 72 h, com os sais nas concentrações de 1  $\mu$ M ou 2  $\mu$ M e também com o PLX4032 nas concentrações de 0,5  $\mu$ M ou 1  $\mu$ M. Após esse período, por meio do método de MTT, foi avaliada a viabilidade das células. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao controle sem tratamento.

**Figura 20.** Efeito da combinação dos compostos MF01 (A), MF02 (B), MF03 (C) e PLX4032 na viabilidade das células SK-MEL-147.

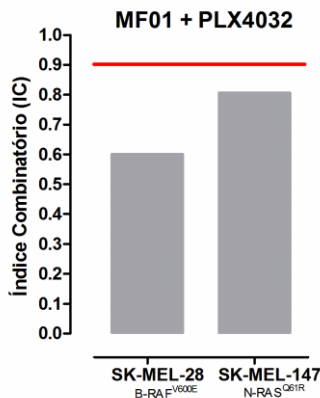


As células, SK-MEL-147, foram plaqueadas e incubadas, por 72 h, com os sais nas concentrações de 1  $\mu$ M ou 2  $\mu$ M e também com o PLX4032 nas concentrações de 1  $\mu$ M ou 2  $\mu$ M. Após esse período, por meio do método de MTT, foi avaliada a viabilidade das células. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao controle sem tratamento.

Como o composto MF01 resultou em diminuição acentuada da viabilidade celular, em ambas as linhagens, quando associado ao PLX-4032, decidiu-se verificar se esse efeito era devido a um efeito sinérgico, aditivo ou antagonístico. Para esta abordagem, baseou-se na definição de Chou (2006) que diz que o sinergismo consiste em um efeito maior do que simplesmente o efeito aditivo, ou seja, o somatório dos efeitos isoladamente, e o antagonismo como um efeito menor do que o aditivo.

A combinação (MF01 + PLX4032) foi analisada pelo programa *CompuSyn*. Este programa permite calcular o Índice Combinatório (IC), baseado na proposta de Chou e Talalay (1984) avaliando o efeito das curvas dose-resposta dos compostos isolados, seguido pela resposta citotóxica que envolve a combinação do sal com o PLX4032. Na (Figura 21), observa-se que a combinação do MF01 com o PLX4032 resultou em um efeito sinérgico para a linhagem SK-MEL-28 (IC = 0,60) e para SK-MEL-147 (IC = 0,80).

**Figura 21. Avaliação do Índice Combinatório (IC) do sal MF01 com o composto PLX4032.**



Para determinar o efeito da combinação (MF01 + PLX4032) foi utilizado o programa *CompuSyn* (versão 1.0). Índices combinatórios < 0,90 (valores abaixo da barra vermelha) são considerados sinérgicos, valores entre 0,9 - 1,0, efeito aditivo e índices > que 1,10 são considerados antagonísticos.

Já no estudo de Niehr *et al.* (2011), a metformina e o vemurafenibe foram associados e incubados por 72 h com a linhagem SK-MEL-28. Como resultado, foi verificada uma ação diferente da que observamos em nosso trabalho. O efeito desta combinação foi de antagonismo, porém o número de células em apoptose aumentou quando comparado com os compostos isolados. No entanto, quando os efeitos da combinação foram avaliados em linhagens com mutações em N-RAS, os autores observaram um efeito sinérgico, na maioria dos casos. Este resultado vem de encontro ao resultado que encontramos na presença de células com esta mutação.

Em outro estudo, a combinação do vemurafenibe com nutlin-3 (um antagonista HDM2 que impede a degradação de p53), embora em diferentes linhagens de melanoma, também resultou em efeito sinérgico (JI *et al.*, 2013). Essa associação possibilitou diminuição da viabilidade de células de melanoma, indução de apoptose e diminuição de crescimento do tumor (JI *et al.*, 2013).

A combinação de fármacos com compostos citotóxicos ou tratamento com moléculas específicas pode ser uma estratégia relevante para melhorar futuras terapias do melanoma (WELLBROCK e HURLSTONE, 2010).

Em suma, a associação dos sais com o vemurafenibe apresenta resposta relevante e uma oportunidade de diminuir a dose dos compostos, sendo que isso pode, talvez, reduzir os efeitos adversos do vemurafenibe e melhorar a resposta aos tratamentos.



## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os compostos MF01, MF02, MF03 foram os compostos mais citotóxicos para as linhagens celulares estudadas, principalmente nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-147;
- O composto MF01 diminuiu a expressão de N-RAS na linhagem SK-MEL-147, que apresenta mutação N-RAS<sup>Q61R</sup>;
- Nessa mesma linhagem, os compostos aumentaram a porcentagem de células apoptóticas, principalmente o sal MF01;
- Os sais de isotiourônio (MF01, MF02 e MF03) provocaram alterações morfológicas nas células (SK-MEL-147) e diminuíram a proliferação celular quando observados microscopicamente;
- Os sais não alteraram as fases do ciclo celular das linhagens SK-MEL-28 e -147, porém um número aumentado de células fragmentadas foi observado;
- Todos os sais diminuíram a migração celular e os compostos MF01 e MF02 também impediram a invasão das células SK-MEL-28;
- A associação de vemurafenibe (PLX4032) com os sais de isotiourônio resultou em diminuição da viabilidade celular com concentrações não citotóxicas, quando isolados;
- A combinação do PLX4032 com o sal de isotiourônio MF01, nas linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-147, resultou em um efeito sinérgico.





## 7. PERSPECTIVAS

Até o momento, este trabalho proporcionou conclusões pertinentes, no entanto, alguns estudos ainda podem ser realizados, para melhor elucidação dos resultados, como:

- Avaliar a expressão de N-RAS e B-RAF após incubação dos sais de isotiourônio na linhagem SK-MEL-28;
- Realizar ensaio de zimografia e expressão de metaloproteinases após incubação com os sais MF01 e MF02, para relacionar os resultados com processo de invasão celular;
- Avaliar a expressão de proteínas de adesão após incubação com o sal MF01;
- Avaliar a fosforilação de ERK e MEK nas células incubadas com os sais pela técnica de *Western blotting* verificando se os sais interferem nessas proteínas.
- Avaliar o tipo de morte celular, determinação de caspases, expressão gênica de B-RAF e N-RAS, fosforilação de ERK e MEK associando os sais de isotiourônio com o vemurafenibe (PLX4032);



## REFERÊNCIAS

- ALLA, V. et al. E2F1 in melanoma progression and metastasis. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 2, p. 127-33, Jan 2010.
- ARNOLD, M. et al. Trends in incidence and predictions of cutaneous melanoma across Europe up to 2015. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, 2013.
- AROZARENA, I. et al. Oncogenic BRAF Induces Melanoma Cell Invasion by Downregulating the cGMP-Specific Phosphodiesterase PDE5A. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 45-57, 2011.
- ASCIERTO, P. A. et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. **Lancet Oncol**, v. 14, n. 3, p. 249-56, 2013.
- ASSUNÇÃO, L. Avaliação da citotoxicidade de sais de isotiourônio e tiazindionas para estudo de leucemia *in vitro*. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2013.
- ATKINS, M. B. et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 7, p. 2105-16, 1999.
- BADAWI, A. M.; AZZAM, E. M. S.; MORSY, S. M. I. Surface and biocidal activity of some synthesized metallo azobenzene isothiuronium salts. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 24, p. 8661-8665, 2006.
- BAI, R. et al. Suppression of lung cancer in murine model: treated by combination of recombinant human endostatin adenovirus with low-dose cisplatin. **J Exp Clin Canc Res**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2009.
- BAKOS, L. et al. European ancestry and cutaneous melanoma in Southern Brazil. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 23, n. 3, p. 304-7, 2009.

BANDARCHI, B. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatol Res Pract**, v. 2010, 2010.

BASAVAI AH, D.; DHARMA RAO, P.; SUGUNA HYMA, R. The Baylis-Hillman reaction: A novel carbon-carbon bond forming reaction. **Tetrahedron**, v. 52, n. 24, p. 8001-8062, 1996.

BASAVAI AH, D.; RAO, K. V.; REDDY, R. J. The Baylis-Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry. **Chem Soc Rev**, v. 36, n. 10, p. 1581-1588, 2007.

BCRJ. **Banco de Células do Rio De Janeiro**. Disponível em: <<http://www.bcrj.hucff.ufrj.br/>>. Acesso em: 27 dez. 2013.

BRANDÃO, L. F. Cytotoxic evaluation of Phenolic Compounds from Lichens against Melanoma Cells. **Chem Pharm.Bull**, v. 61, n. 1, p. 176-183, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria nº 357, de 8 de abril de 2013. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo. Disponível em: <[http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357\\_08\\_04\\_2013.html](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html)>. Acesso em: 14 jan. 2014.

BROHEM, C. A. et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicol In Vitro**, v. 23, n. 1, p. 111-9, 2009.

BUCHHEIT, A. D. et al. Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. **Cancer**, v. 119, n. 21, p. 3821-9, 2013.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6-7, p. 499-503, 2003.

CALLACONDO-RIVA, D. et al. Actividad citotóxica del extracto etanólico de gnaphalium spicatum “keto keto” en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. **Rev Peru Med Exp Salud Pública**, v. 25, p. 1726-4634, 2008.

CAMPBELL, P. M.; DER, C. J. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v. 14, n. 2, p. 105-14, 2004.

CAO, H. H. et al. Quercetin exerts anti-melanoma activities and inhibits STAT3 signaling. **Biochem Pharmacol**, v. 87, n. 3, p. 424-34, 2014.

CHAIDEMENOS, G *et al.* Prevention of malignant melanoma. **Hippokratia**, v. 12, p. 17-21, 2008.

CHANG, A. E.; KARNELL, L. H.; MENCK, H. R. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. **Cancer**, v. 83, n. 8, p. 1664-78, 1998.

CHAPMAN, P. B. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **New Engl J Med**, v. 364, n. 26, p. 2507-16, 2011.

CHENG, Y.; ZHANG, G.; LI, G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. **Cancer Metastasis Rev**, v. 32, n. 3-4, p. 567-84, 2013.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacol Rev**, v. 58, n. 3, p. 621-81, 2006.

\_\_\_\_\_. Preclinical versus clinical drug combination studies. **Leuk Lymphoma**, v. 49, n. 11, p. 2059-80, 2008.

\_\_\_\_\_. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Res**, v. 70, n. 2, p. 440-6, 2010.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Adv Enzyme Regul**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CORY, G. Scratch-wound assay. **Methods Mol Biol**, v. 769, p. 25-30, 2011.

CRESS, R. D.; HOLLY, E. A. Incidence of cutaneous melanoma among non-Hispanic whites, Hispanics, Asians, and blacks: an analysis of california cancer registry data, 1988-93. **Cancer Causes Control**, v. 8, n. 2, p. 246-52, 1997.

CUMMINS, D. L. et al. Cutaneous malignant melanoma. **Mayo Clin Proc**, v. 81, n. 4, p. 500-7, 2006.

DAHL, C.; GULDBERG, P. The genome and epigenome of malignant melanoma. **Apmis**, v. 115, n. 10, p. 1161-76, 2007.

DANKORT, D. et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. **Nat Genet**, v. 41, n. 5, p. 544-52, 2009.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Cytometry of DNA replication and RNA synthesis: Historical perspective and recent advances based on "click chemistry". **Cytometry A**, v. 79, n. 5, p. 328-37, 2011.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949-54, 2002.

DEMUNTER, A. et al. Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma. **J Invest Dermatol**, v. 117, n. 6, p. 1483-9, 2001.

DESMOND, R. A.; SOONG, S. J. Epidemiology of malignant melanoma. **Surg Clin North Am**, v. 83, n. 1, p. 1-29, Feb 2003.

DEVITT, B. et al. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 24, n. 4, p. 666-72, 2011.

EBERLE, J. et al. Overcoming apoptosis deficiency of melanoma—Hope for new therapeutic approaches. **Drug Resist Update**, v. 10, n. 6, p. 218-234, 2007.

EBERTING, C. L. D. et al. Histologic Progression of B16 F10 Metastatic Melanoma in C57BL/6 Mice Over a Six Week Time Period: Distant Metastases before Local Growth. **J Dermatol**, v. 31, p. 299–304, 2004.

EISEN, T. et al. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. **Br J Cancer**, v. 95, n. 5, p. 581-6, 2006.

ERHARDT, P.; SCHREMSER, E. J.; COOPER, G. M. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 8, p. 5308-15, 1999.

ESKANDARPOUR, M. et al. Suppression of oncogenic NRAS by RNA interference induces apoptosis of human melanoma cells. **Int J Cancer**, v. 115, n. 1, p. 65-73, 2005.

FADOK, V. A. et al. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 276, n. 2, p. 1071-7, 2001.

FALCHOOK, G. S. et al. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. **Lancet**, v. 379, n. 9829, p. 1893-901, 2012.

FASSNACHT, M. et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. **New Engl J Med**, v. 366, n. 23, p. 2189-97, 2012.

FAVALORO, B. et al. Role of apoptosis in disease. **Aging (Albany NY)**, v. 4, n. 5, p. 330-49, 2012.

FLAHERTY, K. T. et al. Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. **New Engl J Med**, v. 367, n. 18, p. 1694-1703, 2012.

\_\_\_\_\_. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. **New Engl J Med**, v. 363, n. 9, p. 809-19, 2010.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**, v. 160, n. 2, p. 171-7, 2006.

GARBE, C. et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. **J Invest Dermatol**, v. 102, n. 5, p. 695-9, 1994.

\_\_\_\_\_. Treatment of melanoma. **Dtsch Arztebl Int**, v. 105, n. 49, p. 845-51, 2008.

GORDEN, A. et al. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. **Cancer Res**, v. 63, n. 14, p. 3955-7, 2003.

GORDON, R. Skin Cancer: An Overview of Epidemiology and Risk Factors. **Sem Oncol Nurs**, v. 29, n. 3, p. 160-169, 2013.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-7, 2007.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? **Trends Cell Biol**, v. 8, n. 7, p. 267-71, Jul 1998.

GREINERT, R. Skin cancer: new markers for better prevention. **Pathobiology**, v. 76, n. 2, p. 64-81, 2009.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **J Mol Histol**, v. 35, n. 3, p. 309-18, 2004.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicol In Vitro**, v. 18, n. 5, p. 703-10, 2004.

HAUSCHILD, A. et al. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and



paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 17, p. 2823-30, 2009.

\_\_\_\_\_. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. **Lancet**, v. 380, n. 9839, p. 358-65, 2012.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. **J Natl Cancer I**, v. 93, n. 3, p. 178-193, 2001.

HOCKER, T. L.; SINGH, M. K.; TSAO, H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 11, p. 2575-95, 2008.

HODI, F. S. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **New Engl J Med**, v. 363, n. 8, p. 711-23, 2010.

HOLLA, B. S. et al. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. **Eur J Med Chem**, v. 38, n. 3, p. 313-8, 2003.

HOOD, K., VANLANDINGHAM, J.M. Targeted Therapy for Melanoma: Dabrafenib and Trametinib. **J Pharmacol Clin Toxicol**, v. 1, n.2, p. 1011, 2013.

INCA - **Instituto Nacional de Câncer, Estimativa 2014**. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014\\_final+corrigido+tireoide.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014_final+corrigido+tireoide.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226)>. Acesso em: 07 jan. 2014a.

INCA - **Instituto Nacional de Câncer, agência de notícias**. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/nota\\_esclarecimento\\_taxa\\_ajustada\\_mortalidade\\_por\\_cancer\\_se\\_mantem\\_estavel\\_brasil](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/nota_esclarecimento_taxa_ajustada_mortalidade_por_cancer_se_mantem_estavel_brasil)>. Acesso em: 4 jan. 2014b.

JAFARI, M. et al. Analysis of Ras Mutations in Human Melanocytic Lesions - Activation of the Ras Gene Seems to Be Associated with the Nodular Type of Human-Malignant Melanoma. **J Cancer Res Clin**, v. 121, n. 1, p. 23-30, 1995.

JANSEN, B. et al. Activated N-ras contributes to the chemoresistance of human melanoma in severe combined immunodeficiency (SCID) mice by blocking apoptosis. **Cancer Res**, v. 57, n. 3, p. 362-5, 1997.

JARELL, A. D.; LAWRENCE, D.; TSAO, H. The RAS/mitogen activated protein (MAP) kinase pathway in melanoma biology and therapeutics. **Biologics**, v. 1, n. 4, p. 407-14, 2007.

JI, Z. et al. Vemurafenib synergizes with nutlin-3 to deplete survivin and suppresses melanoma viability and tumor growth. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 16, p. 4383-91, 2013.

JONES, W. O. et al. Incidence of malignant melanoma in Auckland, New Zealand: highest rates in the world. **World J Surg**, v. 23, n. 7, p. 732-5, 1999.

JONESON, T.; BAR-SAGI, D. Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 9, p. 5892-901, 1999.

KABIGTING, F. D. et al. Malignant melanoma in African-Americans. **Dermatol Online J**, v. 15, n. 2, 2009.

KAJSTURA, M. et al. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. **Cytometry A**, v. 71, n. 3, p. 125-31, 2007.

KAUFMANN, W. K. et al. Defective cell cycle checkpoint functions in melanoma are associated with altered patterns of gene expression. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 1, p. 175-87, 2008.

KELLEHER, F. C.; MCARTHUR, G. A. Targeting NRAS in melanoma. **Cancer J**, v. 18, n. 2, p. 132-6, 2012.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, 1972.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. **Semin Cancer Biol**, v. 15, n. 5, p. 378-86, 2005.

KLOOG, Y.; COX, A. D. RAS inhibitors: potential for cancer therapeutics. **Mol Med Today**, v. 6, n. 10, p. 398-402, 2000.

KORONKIEWICZ, M. Proapoptotic effects of new pentabromobenzylisothiuronium salts in a human prostate adenocarcinoma cell line. **Acta Pol Pharm.**, v. 69, n. 6, p 1325-1333, 2012.

KRAMER, N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutat Res**, v. 752, n. 1, p. 10-24, 2013.

KRYSKO, D. V. et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205-21, 2008.

KUPHAL, S. et al. H-cadherin expression reduces invasion of malignant melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 22, n. 3, p. 296-306, 2009.

LAVRIK, I. N.; KRAMMER, P. H. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 36-41, 2012.

LEE, J. H.; CHOI, J. W.; KIM, Y. S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. **Br J Dermatol**, v. 164, n. 4, p. 776-84, 2011.

LEGHA, S. S. et al. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha. **Ann Oncol**, v. 7, n. 8, p. 827-35, 1996.

LEV, D. C. et al. Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis in vivo. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 11, p. 2092-100, 2004.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.

LIAO, Y. et al. Modulation of apoptosis, tumorigenesis and metastatic potential with antisense H-ras oligodeoxynucleotides in a high metastatic tumor model of hepatoma: LCI-D20. **Hepatogastroenterology**, v. 47, n. 32, p. 365-70, 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

MACHADO, K. E. et al. Apoptotic events induced by maleimides on human acute leukemia cell lines. **Chem Res Toxicol**, v. 26, n. 12, p. 1904-16, 2013.

MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R.-M. Non-melanoma skin cancer. **Lancet**, v. 375, n. 9715, p. 673-685, 2010.

MADONNA, G. et al. NF-kappaB as potential target in the treatment of melanoma. **J Transl Med**, v. 10, p. 53, 2012.

MEHLEN, P.; PUISIEUX, A. Metastasis: a question of life or death. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 6, p. 449-58, 2006.

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

MITA, M.; MITA, A.; TOLCHER, A. Apoptosis: mechanisms and implications for cancer therapeutics. **Targeted Oncol**, v. 1, n. 4, p. 197-214, 2006.

MONTAGUT, C. et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. **Cancer Res**, v. 68, n. 12, p. 4853-61, 2008.

MORITA, H.; NAGAI, R. Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **N Engl J Med**, v. 365, n. 15, p. 1448-1450, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NIEHR, F. et al. Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations. **J Transl Med**, v. 9, n. 76, 2011.

NIERO, E. L.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 32, p. 31, 2013.

O'NEILL, E.; KOLCH, W. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. **Br J Cancer**, v. 90, n. 2, p. 283-8, 2004.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592-603, 2004.

OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and cancer. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 9, p. 1441-9, 2011.

ORGAZ, J. L.; SANZ-MORENO, V. Emerging molecular targets in melanoma invasion and metastasis. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 26, n. 1, p. 39-57, 2013.

ORTEGA, A. et al. Tumoricidal activity of endothelium-derived NO and the survival of metastatic cells with high GSH and Bcl-2 levels. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 2, p. 107-14, 2008.

OUHTIT, A. et al. UV-radiation-specific p53 mutation frequency in normal skin as a predictor of risk of basal cell carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, n. 7, p. 523-31, 1998.

PALMIERI, G. et al. Main roads to melanoma. **J Transl Med**, v. 7, p. 86, 2009.

PANNU, V. et al. Synergistic antimicrotubule therapy for prostate cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 81, n. 4, p. 478-87, 2011.

PARK, M. T.; LEE, S. J. Cell cycle and cancer. **J Biochem Mol Biol**, v. 36, n. 1, p. 60-5, 2003.

PATEL, B. P. et al. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. **J Surg Oncol**, v. 90, n. 2, p. 81-8, 2005.

POLLOCK, P. M. et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat Genet**, v. 33, n. 1, p. 19-20, 2003.

POPIOLKIEWICZ, J. et al. In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides. **Cancer Lett**, v. 229, n. 1, p. 67-75, 2005.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7-8, p. 598-601, 2008.

RAMIN, N. et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. **Nature**, v. 468, n. 7326, p. 973-977, 2010.

RIBAS, A.; FLAHERTY, K. T. BRAF targeted therapy changes the treatment paradigm in melanoma. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 7, p. 426-33, 2011.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1458-61, 2006.

ROCKMANN, H.; SHADENDORF, D. From Melanocytes to Melanoma-Apoptosis in Melanoma. **Humana Press**, New Jersey: 2006.

ROSEN, A. et al. Impact of Dermatologic Adverse Events on Quality of Life in 283 Cancer Patients: A Questionnaire Study in a Dermatology Referral Clinic. **Am J Clin Dermatol**, v. 14, n. 4, p. 327-333, 2013.

RUSSAK, J. E.; RIGEL, D. S. Risk Factors for the Development of Primary Cutaneous Melanoma. **Dermatol Clin**, v. 30, n. 3, p. 363-368, 2012.

SEGURA, M. F. et al. BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy. **Cancer Res**, v. 73, n. 20, p. 6264-76, Oct 15 2013.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.

SIMPSON, C. D.; ANYIWE, K.; SCHIMMER, A. D. Anoikis resistance and tumor metastasis. **Cancer Lett**, v. 272, n. 2, p. 177-185, 2008.

SIRIPONG, P. et al. Anti-metastatic effects on B16F10 melanoma cells of extracts and two prenylated xanthenes isolated from *Maclura amboinensis* BI roots. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 7, p. 3519-28, 2012.

SKIN CANCER FOUNDATION – **Warning Signs: The ABCDEs of Melanoma**. Disponível em: <<http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma#panel1-2>>. Acesso em: 08 jav. 2014.

SOENGAS, M. S. et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 207-11, 2001.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138-51, 2003.

SONDERGAARD, J. N. et al. Differential sensitivity of melanoma cell lines with *BRAFV600E* mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. **J Transl Med**, v. 8, n. 39, 2010.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v. 10, n. 6, p. 415-33, 2000.

SU, F. et al. RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. **New Engl J Med**, v. 366, n. 3, p. 207-15, 2012.

SUDHAKAR, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. **J Cancer Sci Ther**, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2009.

SULLIVAN, R. J.; LORUSSO, P. M.; FLAHERTY, K. T. The intersection of immune-directed and molecularly targeted therapy in advanced melanoma: where we have been, are, and will be. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 19, p. 5283-91, 2013.

SUN, P. C. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis and sub-G1 arrest of 320 HSR colon cancer cells. **J Biomed Sci**, v. 17, p. 76, 2010.

SZACHOWICZ-PETELSKA, B. et al. Characterization of the cell membrane during cancer transformation. **J Environ Biol**, v. 31, n. 5, p. 845-850, 2010.

TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, n. 15, p. 1803-15, 2001.

TAKEDA, Y. et al. Diminished metastasis in tetraspanin CD151-knockout mice. **Blood**, v. 118, p.464-472, 2011.

THE NATIONAL CANCER INSTITUTE – Layers of the Skin (Don Bliss). Disponível em: <<https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=4366>>. Acesso em: 08 jan. 2014.

THOMPSON, J. F.; SCOLYER, R. A.; KEFFORD, R. F. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 687-701, 2005.

\_\_\_\_\_. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 687-701, 2005.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies Within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.

TRANI, A. et al. Thioureas and Isothiourenium Salts of the Aglycone of Teicoplanin. Synthesis And Biological-Activity. **J Antibiot**, v. 42, n. 8, p. 1268-1275, 1989.



TSAO, H. et al. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 7-2004. A 48-year-old woman with multiple pigmented lesions and a personal and family history of melanoma. **New Engl J Med**, v. 350, n. 9, p. 924-32, 2004.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif**, v. 36, n. 3, p. 131-49, 2003.

\_\_\_\_\_. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Ann Hematol**, v. 84, n. 10, p. 627-39, 2005.

VU, H. L.; APLIN, A. E. The Yin-Yang of RAF inhibitors. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 25, n. 2, p. 127-8, 2012.

WAINSTEIN, A. J. A.; BELFORT, F. A. Conduta para o melanoma cutâneo. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 31, n. 3, 2004.

WANG, J. et al. Synergistic Combination of Novel Tubulin Inhibitor ABI-274 and Vemurafenib Overcomes Vemurafenib Acquired Resistance in BRAFV600E Melanoma. **Mol Cancer Ther**, v. 13, n. 1, 2014.

WANG, H. M.; CHEN, C. Y.; WU, P. F. Isophilippinolide A Arrests Cell Cycle Progression and Induces Apoptosis for Anticancer Inhibitory Agents in Human Melanoma Cells. **J Agric Food Chem**, 2014.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10202, 2010.

WELLBROCK, C.; HURLSTONE, A. BRAF as therapeutic target in melanoma. **Biochem Pharmacol**, v. 80, n. 5, p. 561-7, 2010.

WELLBROCK, C.; KARASARIDES, M.; MARAIS, R. The RAF proteins take centre stage. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 11, p. 875-85, 2004.

WHITEMAN, D. C.; PAVAN, W. J.; BASTIAN, B. C. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 24, n. 5, p. 879-97, 2011.

WHO - **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.htmL>>. Acesso em: 07 jan. 2014.

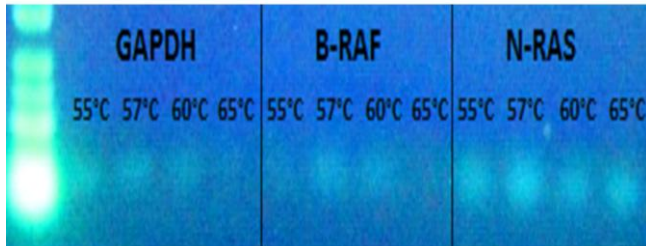
WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol**, v. 226, n. 2, p. 352-364, 2012.

WOLFEL, T. et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. **Science**, v. 269, n. 5228, p. 1281-4, 1995.

ZANETTI, R. et al. Cutaneous melanoma and sunburns in childhood in a Southern European population. **Eur J Cancer**, v. 28, n. 6-7, p. 1172-1176, 1992.

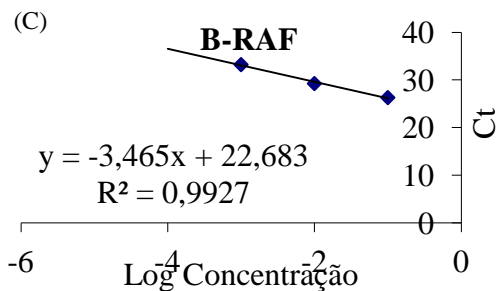
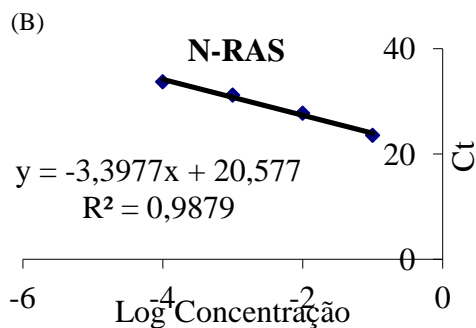
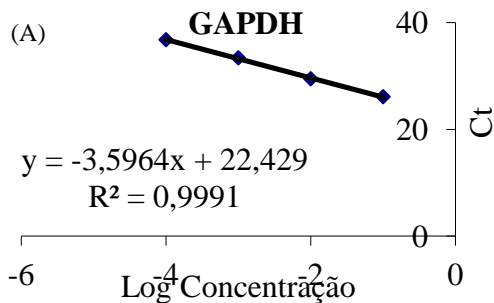
ZUIDERVAART, W. et al. Activation of the MAPK pathway is a common event in uveal melanomas although it rarely occurs through mutation of BRAF or RAS. **Br J Cancer**, v. 92, n. 11, p. 2032-8, 2005.

**APÊNDICE A. Gel de agarose contendo *Sybr Safe*® para verificar a melhor temperatura de anelamento por meio da técnica de PCR convencional.**



As temperaturas utilizadas foram 55 °C, 57 °C, 60 °C e 65 °C.

**APÊNDICE B. Gráficos das curvas de eficiência dos iniciadores.**



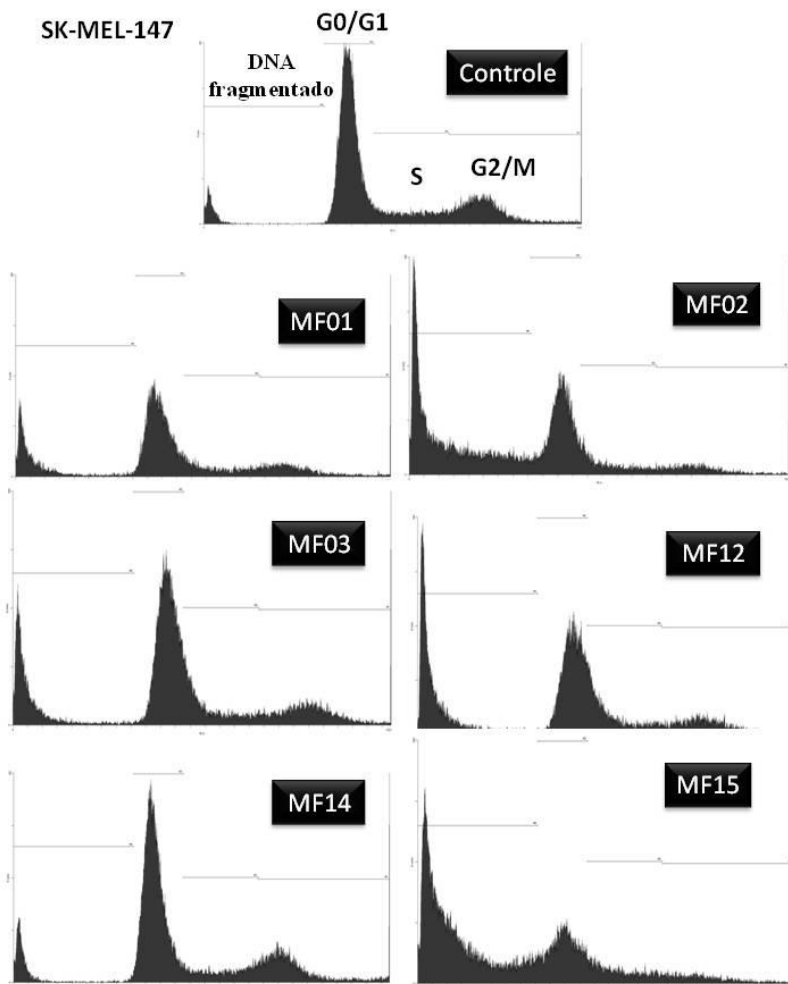
(A) Curva do gene GAPDH. (B) Curva do gene N-RAS. (C) Curva do gene B-RAF. As curvas foram obtidas pela técnica de qPCR utilizando diferentes concentrações de cDNA para todos os pares de iniciadores. A amplificação foi realizada utilizando o *Power SYBR-Green PCR Master Mix* (Thermo Scientific®).

**APÊNDICE C. Eficiência dos iniciadores.**

Iniciadores	Eficiência
GAPDH	90%
N-RAS	97%
B-RAF	94%

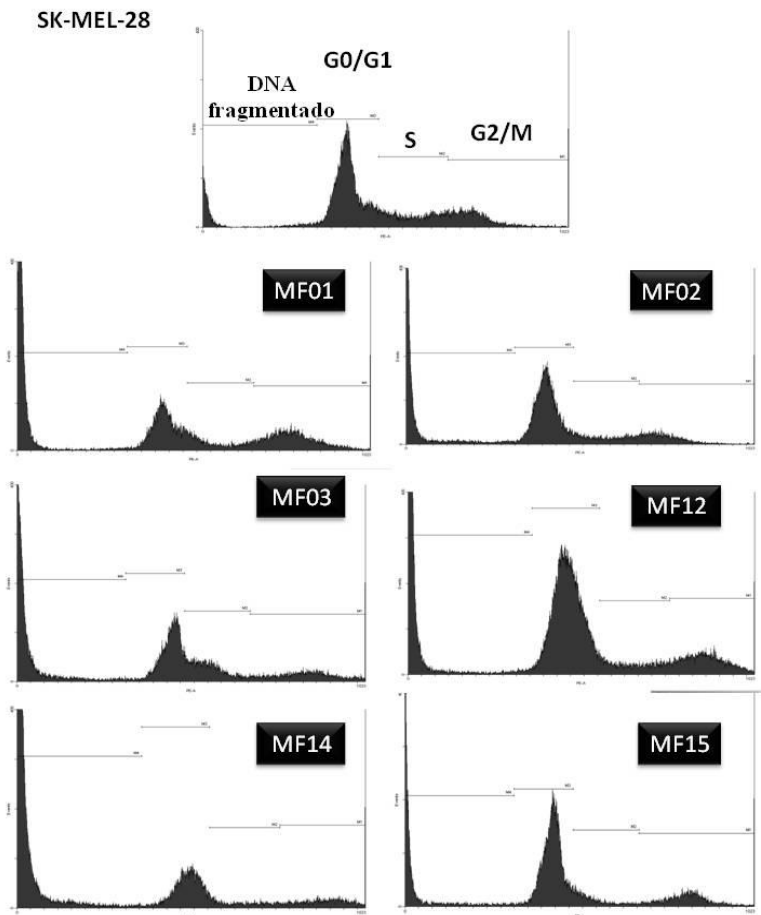
**Para o cálculo de eficiência de amplificação dos produtos foi utilizada a análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da concentração.**

**APÊNDICE D. Histograma do ensaio de ciclo celular e fragmentação de DNA da linhagem SK-MEL-147.**



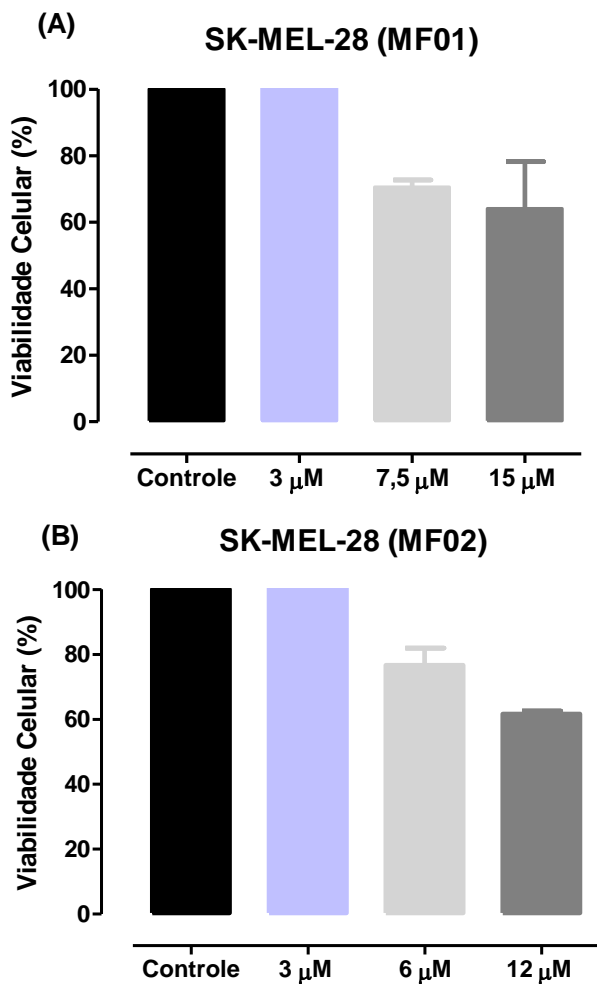
As células foram tratadas com a  $CC_{50}$  dos sais, por 24 h e analisadas por citometria de fluxo. A distribuição das células no ciclo está representada pelas fases G0/G1, S e G2/M. Os histogramas representam dados de um experimento.

**APÊNDICE E. Histograma do ensaio de ciclo celular e fragmentação de DNA da linhagem SK-MEL-28.**



As células foram tratadas com a  $CC_{50}$  dos sais, por 24 h e analisadas por citometria de fluxo. A distribuição das células no ciclo está representada pelas fases G0/G1, S e G2/M. Os histogramas representam dados de um experimento.

**APÊNDICE F. Viabilidade das células SK-MEL-28 após 48 h de incubação com os sais MF01 e MF02.**



As células foram plaqueadas e incubadas por 48 h com os sais. Após este período, foi avaliada a viabilidade das células pelo método de MTT.