

Débora Mocellin

**ESTUDOS *IN VITRO* DA MODULAÇÃO DO  
MICROAMBIENTE TUMORAL:  
UMA RELAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO, MELANOMA  
E OBESIDADE**

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

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabíola Branco  
Filippin Monteiro

Florianópolis  
2016

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

Mocellin, Débora

Estudos in vitro da modulação do microambiente tumoral:  
: uma relação entre inflamação, melanoma e obesidade /  
Débora Mocellin ; orientadora, Fabíola Branco Filippin  
Monteiro - Florianópolis, SC, 2016.  
110 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Inflamação. 3. Melanoma. 4. Obesidade.  
5. Citocinas. I. Filippin Monteiro, Fabíola Branco. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Farmácia. III. Título.

Débora Mocellin

**ESTUDOS *IN VITRO* DA MODULAÇÃO DO MICROAMBIENTE  
TUMORAL: UMA RELAÇÃO ENTRE INFLAMAÇÃO,  
MELANOMA E OBESIDADE**

Florianópolis, 04 de Março de 2016.

---

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

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabíola Branco Filippin Monteiro  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Dr.<sup>a</sup> Jade de Oliveira  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina Rabello de Moraes  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís Cristine Marques Sincero  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoia e me traz motivação para seguir evoluindo na vida.



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de, primeiramente, agradecer a Deus por todas as oportunidades que se abriram a mim, e por iluminar meu caminho.

Ao programa de pós-graduação em farmácia, por conceder o privilégio de realizar este estudo.

Agradeço imensamente o auxílio e orientação que me foram dados pela Professora Fabíola Monteiro. Sua ajuda foi, sem dúvida, de extrema importância para que eu conseguisse realizar este trabalho. Entendo que suas intenções sempre foram as melhores e que aprendemos muito uma com a outra durante estes dois anos.

À Professora Tânia Pasa, por ter cedido espaço para que eu realizasse este estudo em seu laboratório e por ter me aceitado no GEIMM.

À minha família, que permanece firme ao meu lado em todos os momentos, dando-me forças para continuar esta jornada. Muito obrigada por acreditarem no meu potencial, mais do que eu mesma possa acreditar. O carinho de vocês, mesmo de longe, me faz seguir em frente com entusiasmo e determinação.

A todos os colegas que fazem parte do grupo GEIMM e LAITA, por terem me acolhido durante este período e me auxiliado em vários experimentos. Sentirei saudades do convívio diário com vocês.

Aos membros da banca examinadora, agradeço pela disponibilidade em avaliarem meu trabalho.

Meus agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter concedido a bolsa de mestrado.

E também, aos meus amigos, que sempre me apoiaram e me enviaram boas energias para que eu realizasse este estudo.

A todos, que de alguma maneira estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta caminhada valer a pena, meus sinceros agradecimentos!

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt



## RESUMO

Inúmeros estudos demonstram que a inflamação em indivíduos obesos está fortemente associada com um maior risco de desenvolvimento e progressão tumoral. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma das citocinas responsáveis pela iniciação e progressão de tumores, como também a amiloide sérica A (SAA), proteína produzida pelo fígado e pelo tecido adiposo em condições de inflamação. Além disso, ligantes do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), como o EGF, demonstraram efeitos no favorecimento da proliferação celular e metástase. Neste sentido, analisamos se o soro de pacientes obesos e meio de cultura suplementado com citocinas poderiam criar um microambiente favorável ao crescimento tumoral com células de melanoma, além de verificar alterações na expressão gênica relacionada à progressão tumoral (B-RAF e N-RAS). Realizamos o ensaio clonogênico, o ensaio de migração 2D e ciclo celular em três linhagens de melanoma, SK-mel-19, SK-mel-28 e SK-mel-147. Uma delas, a SK-mel-28, demonstrou uma resposta mais intensa em relação à migração e capacidade clonogênica quando tratada com TNF- $\alpha$  e EGF. Deste modo, as células com mutação em B-RAF (SK-mel-28) foram tratadas com soro de 10 pacientes com IMC acima de 30 kg/m<sup>2</sup>, e 6 indivíduos com IMC abaixo de 25kg/m<sup>2</sup>, TNF- $\alpha$  (25 e 50 pg/mL), EGF (100 ng/mL), IL-1 $\beta$  (10 pg/mL), IL-6 (10 pg/mL), MCP-1 (25 pg/mL) e SAA (75 ng/mL) a fim de avaliar os efeitos de componentes inflamatórios na migração pelo ensaio de migração 2D, e na expressão de B-RAF e N-RAS por PCR em tempo real. Também analisamos estes tratamentos na co-cultura de SK-mel-28 e mononucleares isolados do sangue periférico (PBMC). Foi observado um aumento na capacidade migratória das células de melanoma quando tratadas com soro dos obesos, rico em SAA (soros com concentração de SAA 50 vezes maior do valor de referência), além do tratamento com TNF- $\alpha$ . O soro dos obesos aumentou a expressão de N-RAS nas células de melanoma, fato também observado após tratamento com IL-6. As citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 ampliaram a expressão de B-RAF. No ensaio clonogênico, os tratamentos com EGF e TNF- $\alpha$  aumentaram a capacidade clonogênica. Além disso, na co-cultura de melanoma com mononucleares, as células foram capazes de liberar citocinas no sobrenadante após tratamento com proteínas inflamatórias. Os resultados demonstraram uma associação entre as citocinas envolvidas em situação de obesidade (TNF- $\alpha$ , EGF, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 e SAA) e progressão tumoral, e sugerem que as citocinas pró-inflamatórias podem servir como alvo secundário no tratamento do melanoma. É necessário um aperfeiçoamento no entendimento dos efeitos das citocinas nas células de melanoma a fim de desenvolver novas abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer.

**Palavras-chave:** Melanoma; Inflamação; Obesidade; Citocinas.



# **IN VITRO STUDIES OF TUMOR MICROENVIRONMENT MODULATION: A RELATIONSHIP BETWEEN INFLAMMATION, MELANOMA AND OBESITY**

## **ABSTRACT**

It has been shown that low-grade inflammation on obese patients is strongly associated with an increased risk of cancer development and tumor progression. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is one of the cytokines that are responsible for both initiation and progression of tumors, as well as serum amyloid A (SAA), a cytokine produced by both liver and adipose tissue in inflammatory conditions. In addition, epidermal growth factor receptor (EGFR) ligands, such as EGF, have also demonstrated effect on fostering cell proliferation, tumor resistance and metastasis. Therefore, we examined whether serum from obese patients and cytokine-supplemented medium could create a growth-enhancing microenvironment in melanoma cells and gene expression alterations regarding tumor progression in melanoma (B-RAF and N-RAS). We performed clonogenic assay, scratch assay and cell cycle analysis in three different melanoma cell lines. One of them (SK-mel-28) demonstrated a major improvement regarding migration and clonogenicity when treated with TNF- $\alpha$  and EGF. Therefore, B-RAF mutated melanoma cells (SK-mel-28) were treated with serum from 10 patients with BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>, and 6 individuals with BMI < 25 kg/m<sup>2</sup>, TNF- $\alpha$  (25 and 50 pg/mL), EGF (100 ng/mL), IL-1 $\beta$  (10 pg/mL), IL-6 (10 pg/mL), MCP-1 (25 pg/mL) and SAA (75 ng/mL) in order to evaluate the effect of these cytokines on 2D cell migration, along with B-RAF and N-RAS gene expression by real-time PCR. We also analyzed these treatments in co-culture of SK-mel-28 and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). An improve in melanoma cell migration was observed on cells treated with SAA-rich serum of obese patients (sera with a 50-fold increment of SAA above reference value), along with TNF- $\alpha$ -treated cells. Likewise, SAA-rich serum increased N-RAS gene expression in melanoma cells, fact observed with treatment with IL-6 as well. Cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-6 increased the expression of B-RAF. In clonogenic assay, treatment with EGF increased the colony-forming potential, as well as TNF- $\alpha$ . Furthermore, when in co-culture of melanoma with PBMC, cells were able to release cytokines in supernatant after treatment with inflammatory proteins. The results demonstrated an association between cytokines involved in obesity (TNF- $\alpha$ , EGF, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 and SAA) and tumor progression, moreover, these cytokines may be target for melanoma treatment. The improvement in the understanding of the effects of cytokines in tumor cells is important in order to pave the way for new therapeutic approaches for cancer treatment.

**Keywords:** Melanoma; Inflammation; Obesity; Cytokines.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Câncer de pele não melanoma.....	27
Figura 2. Camadas da pele.....	28
Figura 3. Câncer de pele do tipo melanoma.....	29
Figura 4. Progressão do melanoma.....	30
Figura 5. Cascata das MAPK.....	32
Figura 6. Polarização de macrófagos.....	35
Figura 7. Microambiente tumoral.....	36
Figura 8. Primeira etapa:.....	47
Figura 9. Segunda etapa:.....	48
Figura 10. Ensaio clonogênico SK-mel-19.....	57
Figura 11. Fotos representativas do ensaio clonogênico.....	57
Figura 12. Ensaio clonogênico SK-mel-28.....	58
Figura 13. Fotos representativas do ensaio clonogênico após sete dias de tratamento.....	58
Figura 14. Ensaio clonogênico SK-mel-147.....	59
Figura 15. Fotos do ensaio clonogênico após 7 dias de tratamento.....	59
Figura 16. Ensaio de migração 2D com SK-mel-19.....	60
<b>Figura 17.</b> Fotos representativas do ensaio de migração 2D com SK-mel-19.....	60
Figura 18. Ensaio de migração 2D com SK-mel-28.....	61
<b>Figura 19.</b> Fotos representativas do ensaio de migração 2D com SK-mel-28.....	61
Figura 20. Ensaio de migração 2D com SK-mel-147.....	62
Figura 21. Fotos representativas do ensaio de migração 2D com SK-mel-147. Aumento de 100x.....	62
Figura 22. Análise do ciclo celular SK-mel-19.....	63
Figura 23. Histogramas representativos da análise do ciclo celular de SK-mel-19.....	63
<b>Figura 24.</b> Análise do ciclo celular SK-mel-28.....	64
Figura 25. Histogramas representativos da análise do ciclo celular de SK-mel-28.....	64
Figura 26. Análise do ciclo celular SK-mel-147.....	65
Figura 27. Histogramas representativos da análise do ciclo celular de SK-mel-147.....	65
Figura 28. Fotos da co-cultura de melanoma e PBMC.....	66
Figura 29. Concentração de citocinas após tratamento com TNF- $\alpha$ e EGF.....	67
Figura 30. Quantificação de citocinas no sobrenadante da co-cultura.....	68
Figura 31. Expressão gênica de B-RAF e N-RAS.....	69
<b>Figura 32.</b> Resultado do IMC dos obesos e magros, SAA e MCP-1.....	70
<b>Figura 33.</b> Determinação de citocinas no sobrenadante.....	72
<b>Figura 34.</b> Ensaio de migração de SK-mel-28 estimulada com soro dos indivíduos magros e obesos.....	73
<b>Figura 35.</b> Fotos representativas do ensaio de migração com células de melanoma estimuladas com soro de indivíduos obesos e magros.....	73

**Figura 36.** Expressão gênica relativa de B-RAF e N-RAS após estímulo com soro do grupo dos obesos e dos magros.....74

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Características das linhagens celulares de melanoma .....	49
Tabela 2. Iniciadores utilizados na reação de qPCR .....	55
Tabela 3. Resultados dos experimentos iniciais.....	65
Tabela 4. Caracterização dos grupos de indivíduos obesos e magros .....	69





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
B-RAF	Proto-oncogene BRAF (proteína cinase serina/treonina)
CCB	Carcinoma de células basais
CCE	Carcinoma de células escamosas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	<i>Cycle Threshold</i> (limiar de fase exponencial)
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Ácido dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Acido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent assay</i>
ERK	Cinase ativada por sinal extracelular
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)1-piperazinil]-etanosulfônico
HU	Hospital Universitário
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MAT	Macrófagos associados ao tumor
MCR	Melanoma de crescimento radial
MCRM	Melanoma de crescimento radial microinvasivo
MCV	Melanoma de crescimento vertical
MMP	Metaloproteinases
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear Kappa B
N-RAS	Homólogo do oncogene viral RAS do neuroblastoma (v-ras)
PBS	Tampão fosfato salino
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídio
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa

RNA	Ácido ribonucleico
SAA	Amiloide sérica A
SFB	Soro fetal bovino
SK-MEL-19	Linhagem celular de melanoma humano
SK-MEL-28	Linhagem celular de melanoma humano
SK-MEL-147	Linhagem celular de melanoma humano
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV	Radiação ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)
WT	<i>Wild Type</i> (selvagem)

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>27</b>
2.1.	MELANOMA MALIGNO.....	27
2.1.1.	<i>Cascata das MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno...</i>	31
2.2.	MICROAMBIENTE TUMORAL E MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR.....	33
2.2.1.	<i>Inflamação e melanoma.....</i>	36
2.2.1.	<i>Citocinas pró-inflamatórias .....</i>	39
2.3.	INFLAMAÇÃO E OBESIDADE .....	41
2.3.1.	<i>Melanoma e obesidade .....</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
3.1.	OBJETIVO GERAL .....	45
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>4.</b>	<b>FLUXOGRAMA DE EXPERIMENTOS .....</b>	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
5.1.	PRIMEIRA ETAPA – INFLAMAÇÃO COM CITOCINAS ....	49
5.1.1.	<i>Células e condições de cultura.....</i>	49
5.1.1.1.	<b>Linhagens celulares.....</b>	49
5.1.1.2.	<b>Cultivo celular .....</b>	50
5.1.2.	<i>Tratamento com citocinas .....</i>	50
5.1.3.	<i>Ensaio clonogênico .....</i>	50
5.1.4.	<i>Ensaio de migração 2D (Scratch Assay) .....</i>	51
5.1.5.	<i>Análise do ciclo celular .....</i>	51
5.1.6.	<i>Separação de mononucleares (PBMC).....</i>	52
5.1.7.	<i>Co-cultura direta .....</i>	53
5.1.8.	<i>Reação Imunoenzimática (ELISA).....</i>	53
5.1.9.	<i>Expressão gênica de B-RAF e N-RAS.....</i>	54
5.1.9.1.	Extração de RNA total .....	54
5.1.9.2.	Síntese de DNA complementar .....	54
5.1.9.3.	Reação de PCR em tempo real (qPCR).....	54
5.2.	SEGUNDA ETAPA – INFLAMAÇÃO COM SORO DE INDIVÍDUOS OBESOS E MAGROS .....	55
5.2.1.	<i>Soro dos grupos obesos e magros .....</i>	55
5.2.2.	<i>Caracterização dos indivíduos obesos e magros.....</i>	55
5.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>

6.1.	RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA .....	57
<b>6.1.1.</b>	<b><i>Ensaio clonogênico</i></b> .....	57
6.1.1.1.	SK-mel-19 .....	57
6.1.1.2.	SK-mel-28 .....	58
6.1.1.3.	SK-mel-147 .....	58
<b>6.1.2.</b>	<b><i>Ensaio de migração 2D</i></b> .....	59
6.1.2.1.	SK-mel-19 .....	59
6.1.2.2.	SK-mel-28 .....	61
6.1.2.3.	SK-mel-147 .....	62
<b>6.1.3.</b>	<b><i>Análise do Ciclo Celular</i></b> .....	63
6.1.3.1.	SK-mel-19 .....	63
6.1.3.2.	SK-mel-28 .....	63
6.1.3.3.	SK-mel-147 .....	64
<b>6.1.4.</b>	<b><i>Resumo dos resultados preliminares</i></b> .....	65
6.2.	CO-CULTURA DE MELANOMA E MONONUCLEARES ....	66
<b>6.2.1.</b>	<b><i>Determinação de citocinas no sobrenadante da co-cultura de melanoma e mononucleares tratados com estímulos inflamatórios (TNF-<math>\alpha</math> e EGF)</i></b> .....	66
<b>6.2.2.</b>	<b><i>Determinação das citocinas na co-cultura tratada com citocinas recombinantes</i></b> .....	67
<b>6.2.3.</b>	<b><i>Expressão gênica de B-RAF e N-RAS de células de melanoma tratadas com citocinas</i></b> .....	68
6.3.	RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA .....	69
<b>6.3.1.</b>	<b><i>Soro dos indivíduos obesos e magros</i></b> .....	69
<b>6.3.2.</b>	<b><i>Determinação de citocinas no sobrenadante da co-cultura estimulada com soro dos indivíduos</i></b> .....	71
<b>6.3.3.</b>	<b><i>Migração 2D de células de melanoma estimuladas com soro de obesos e magros</i></b> .....	72
<b>6.3.4.</b>	<b><i>Expressão gênica de B-RAF e N-RAS de células de melanoma estimuladas com soro dos indivíduos</i></b> .....	74
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	75
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	81
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83
	<b>APÊNDICE A – REAGENTES</b> .....	976
	<b>APÊNDICE B – CURVAS DE CALIBRAÇÃO ELISA</b> .....	998
	<b>APÊNDICE C – CURVA DE EFICIÊNCIA DOS PRIMERS DO PCR</b> .....	1010
	<b>APÊNDICE D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	1021

<b>APÊNDICE E - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>103</b>
<b>APÊNDICE F - CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS DO GRUPO OBESOS.....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE G – APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS .....</b>	<b>1089</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O câncer representa uma das principais causas de morte em todo o mundo e é responsável por aproximadamente 8,2 milhões de mortes por ano. Estima-se um aumento de 70 % de novos casos de câncer no mundo nas próximas duas décadas (WHO, 2015a). De acordo com a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (2016), o Brasil registrará aproximadamente 596 mil casos de câncer no ano de 2016, sendo 295.200 entre os homens e 300.870 entre as mulheres. Se medidas efetivas não forem tomadas, haverá 26 milhões de casos novos e 17 milhões de mortes por ano no mundo em 2030 (INCA, 2016a).

O câncer é um termo que abrange um amplo grupo de doenças capazes de afetar qualquer parte do corpo. As principais características do câncer estão relacionadas à exacerbada proliferação celular e perda da capacidade destas células em contornar erros no material genético durante esta proliferação (HANAHAN; WEINBERG, 2011; INCA, 2016a). A sua detecção em estágios iniciais, diagnóstico correto e tratamento efetivo, incluindo medicamentos paliativos, aumentam a taxa de sobrevivência dos indivíduos com câncer e melhoram o prognóstico para esta doença (WHO, 2015a).

As células tumorais apresentam algumas alterações, entre elas estão a capacidade de inativação de supressores de crescimento celular, resistência à apoptose, imortalização, indução de angiogênese, incluindo mecanismos de invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dentre os diversos tipos de câncer, o que apresenta maior incidência é o câncer de pele. Este é classificado em carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas e melanoma. Apesar de corresponder a apenas 4 % de todos os casos de câncer de pele, o melanoma é a doença que representa a maior taxa de mortalidade, portanto é considerado o mais agressivo. Indivíduos caucasianos apresentam cerca de 20 vezes mais chances de desenvolver melanoma do que indivíduos afrodescendentes (LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015; WHO, 2015b).

Embora existam vários fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma, como histórico familiar, tipo de pele, presença de nevos, idade, etnia e profissão; a exposição à radiação ultravioleta (UV) continua sendo o principal fator, podendo causar alterações no DNA devido ao fato de ser um potente carcinógeno (CUMMINS et al., 2006; PARAISO et al., 2012).

Além destes fatores de risco, estudos recentes comprovam a associação entre inflamação e diferentes estágios de desenvolvimento

tumoral, incluindo progressão, invasão e metástase (FAN et al., 2013; MARU; GANDHI; RAMCHANDANI, 2014). Em relação ao câncer de pele, existem duas vias que fazem esta conexão: a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca envolve a ativação de oncogenes, como N-RAS e B-RAF, além da inativação de genes supressores tumorais, como o p53 (HOCKER; SINGH; TSAO, 2008; MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Em contraste, a via extrínseca representa a inflamação provocada por infiltrado leucocitário e a presença de mediadores inflamatórios, incluindo fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), aumentando o risco de desenvolvimento de células tumorais (MANTOVANI et al., 2008).

Algumas citocinas inflamatórias apresentam papel crucial na progressão do câncer. Elas são capazes de controlar o processo inflamatório a fim de iniciar a atividade imune antitumoral (IL-12, TNF ligado ao receptor pró-apoptótico), ou favorecer a progressão tumoral (IL-6, IL-17 e IL-23), além de apresentarem efeitos diretos sobre o crescimento e sobrevivência de células tumorais de melanoma (EGF, IL-6, TNF- $\alpha$ ) (HAGHNEGHAHDAR et al., 2000).

O TNF- $\alpha$  apresenta funções antitumorais e pró-tumorais (BERTAZZA; MOCELLIN, 2010) por ativar diversas cascatas de sinalização, como NF- $\kappa$ B, MAPK e caspase 8 (HORSSSEN; HAGEN; EGGERMONT, 2006). Esta citocina, que pode ser secretada por macrófagos e células tumorais (ANDERSON; NAKADA; DEWITTE, 2004), desempenha importante função nos estágios iniciais da carcinogênese, como angiogênese, invasão e proliferação (SZLOSAREK; CHARLES; BALKWILL, 2006). A IL-6 é capaz de induzir fatores inflamatórios e de angiogênese, como interleucina 8 (IL-8), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator quimiotático de macrófagos 1 (MCP-1), favorecendo além da migração e invasão das células tumorais, a progressão de células benignas para malignas (LEDERLE et al., 2011; MARU; GANDHI; RAMCHANDANI, 2014). A IL-1 é outra importante citocina e pode ser secretada por monócitos e macrófagos, levando a uma situação de inflamação aguda (APTE et al., 2006). Esta citocina está relacionada à contribuição da proliferação de células tumorais (RUNDHAUG; FISCHER, 2010).

O microambiente tumoral é, portanto, composto por uma vasta quantidade de citocinas, fibroblastos, além de células do sistema imune, principalmente macrófagos (MANTOVANI et al., 2002; SOLINAS et al., 2009). Os macrófagos associados ao tumor (MAT) podem representar mais de 50 % da massa tumoral, e são polarizados a M2



(alternativamente ativados). Estes macrófagos apresentam funções pró-tumorais, por exemplo, favorecer a sobrevivência de células malignas, aumentar sua proliferação e disseminação (MANTOVANI; SICA ; LOCATI, 2005; SICA et al., 2006).

Estudos comprovam que células tumorais, quando na presença de tecido adiposo, tornam-se mais agressivas, proliferando-se mais rapidamente (ZHANG et al., 2009). O tecido adiposo branco, composto por adipócitos, pré-adipócitos, macrófagos, fibroblastos e leucócitos, é caracterizado pela produção e liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e MCP-1 (FONTANA et al., 2007; WOZNIAK et al., 2009). De acordo com Fontana e colaboradores (2007), a liberação de citocinas pelo tecido adiposo branco (também chamadas de adipocinas) torna-se de extrema importância na relação entre obesidade e inflamação.

Devido à forte relação entre inflamação, câncer e obesidade, este trabalho visa estabelecer uma conexão com o melanoma, vinculando-o com o microambiente inflamatório e citocinas presentes no tecido adiposo em situação de obesidade.



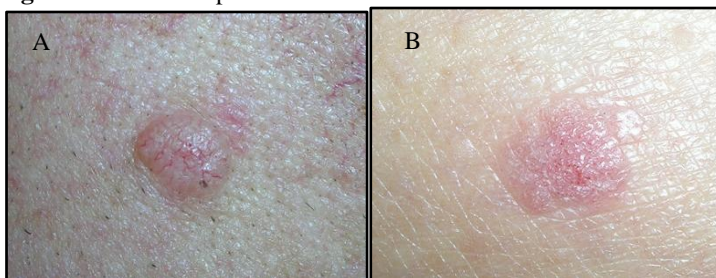
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. MELANOMA MALIGNO

O câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente no Brasil, sendo responsável por 25 % de todos os tumores malignos registrados no país. Segundo o INCA (2016b), estima-se o surgimento de 80.850 novos casos de câncer de pele não melanoma em homens no Brasil, e de 94.910 em mulheres no próximo ano. Este tipo de câncer de pele é o mais incidente em homens nas regiões Sul, Centro-Oeste e Sudeste do país. Em mulheres é o mais frequente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Sul e Nordeste. Em relação ao melanoma que apresenta elevada letalidade, a incidência é baixa, correspondendo a 4 % de todos os casos de câncer de pele. A maior incidência ocorre na região Sul.

Portanto, a maioria dos casos de câncer de pele corresponde ao surgimento de câncer do tipo não-melanoma, os quais são originados a partir de células epiteliais queratinizadas (LEITER; GARBE, 2008). Entre eles, podem-se citar o carcinoma de células basais (CCB) e o carcinoma de células escamosas (CCE) (Figura 1) (GALLAGHER et al., 1995; FECHER; SHARFMAN, 2015). O CCB origina-se na camada basal da epiderme (Figura 2) e é causado por mutações induzidas por radiação ultravioleta, deste modo surge, principalmente, em áreas mais expostas ao sol. Este tipo de câncer apresenta um desenvolvimento lento que raramente provoca metástase (AHMED et al., 2008; LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015).

**Figura 1.** Câncer de pele não melanoma.



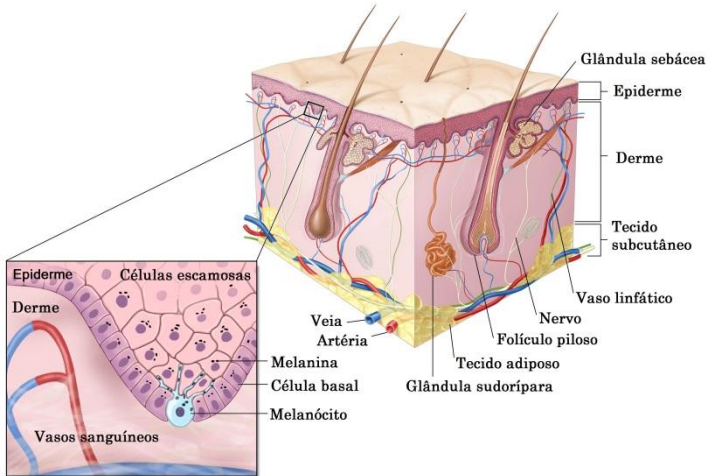
(A) Câncer de células basais; (B) Câncer de células escamosas.

**Fonte:** <[www.cancer.org/cancer/skincancer/galleries/skin-cancer-images#13](http://www.cancer.org/cancer/skincancer/galleries/skin-cancer-images#13)>

O CCE surge da proliferação descontrolada de queratinócitos da epiderme (Figura 2), e também é provocado principalmente por radiação

ultravioleta. Além disso, o risco de desenvolvimento deste câncer pode aumentar com radioterapia, especialmente em indivíduos susceptíveis à queimadura solar (AHMED et al., 2008; LINARES; ZAKARIA; NIZRAN, 2015).

**Figura 2.** Camadas da pele.



**Fonte:** Adaptado de <[www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq](http://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq)>

Já o melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nas células produtoras de melanina (melanócitos) e tem predominância em indivíduos de pele clara (INCA, 2016c). O melanoma pode ocorrer em qualquer tecido que contenha melanócitos, tais como mucosa oral, nasofaringe, seios paranasais, trato urinário, sistema nervoso central, entre outros sistemas (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Felizmente, a maioria dos melanomas surge sobre a superfície da pele facilitando assim a sua detecção (CUMMINS et al., 2006).

A Figura 3 ilustra as características dos nevos de melanoma, os quais podem ser identificados a partir do método ABCD, levando em consideração a assimetria, borda não delimitada, cor desigual (variando do marrom, vermelho ao rosa), e diâmetro maior ou igual a 5 milímetros.

**Figura 3.** Câncer de pele do tipo melanoma



**Fonte:** Melanoma Education Foundation (2016)

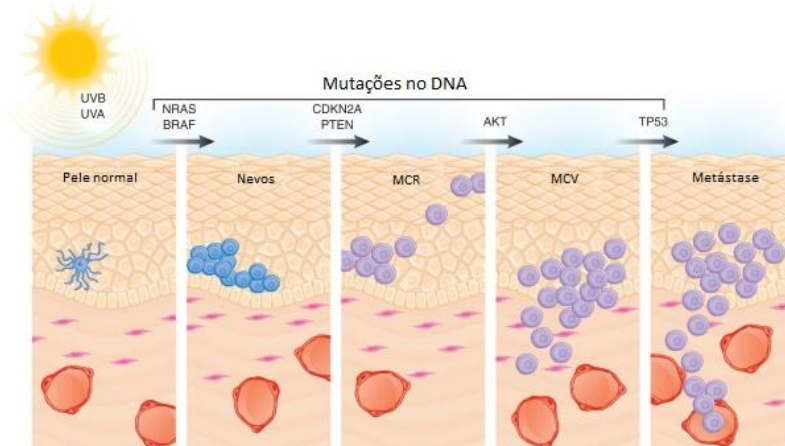
Como já citado, os fatores de risco para o surgimento do melanoma incluem fatores demográficos (cor da pele, presença de nevos pelo corpo, gênero e idade), fatores genéticos (histórico familiar), e fatores ambientais, os quais envolvem presença de imunossupressão, obesidade e o principal fator de risco, a exposição à radiação UV (GANDINI; AUTIER; BONIOL, 2011; AZOURY; LANGE, 2014).

Existem quatro subtipos de melanoma: o melanoma letiginoso acral, é o tipo mais raro, de 5 a 10 % dos casos de melanoma, e surge mais frequentemente em extremidades do corpo, como nos pés e na palma das mãos, portanto não é associado à exposição UV. O melanoma lentigo maligno, o qual surge principalmente em indivíduos de idade avançada e em áreas do corpo que sofreram exposição solar crônica. É responsável por 5 a 15 % dos casos. O nodular, considerado agressivo por não possuir uma fase de crescimento radial prévio, e é o segundo tipo mais comum de melanoma, responsável por 15 a 35 % dos casos desta doença. E o melanoma de crescimento superficial, corresponde ao tipo mais frequente (de 50 a 75 %) e pode ocorrer em indivíduos de qualquer idade (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; BANDARCHI et al., 2010).

O melanoma apresenta três fases clínicas e histomorfológicas de desenvolvimento tumoral (GUERRY et al., 1993; ZAIDI, DAY E MERLINO, 2008):

- (1) Melanoma maligno confinado à epiderme (melanoma *in situ*), também chamado de melanoma de crescimento radial (MCR) (figura 4);
- (2) Melanoma de crescimento radial microinvasivo (MCRM), o qual apresenta células malignas na superfície da derme;
- (3) Melanoma de crescimento vertical (MCV) (figura 4), que representa a fase invasiva do câncer.

**Figura 4.** Progressão do melanoma



A ilustração demonstra a progressão do melanoma humano. A proliferação anormal de melanócitos, possivelmente provocada em resposta à radiação UV, resulta na formação de nevos benignos. A fase de crescimento radial (MCR) exibe a habilidade dos melanócitos em relação à proliferação intraepidérmica, seguida de invasão na derme (MCV), culminando em metástase.

**Fonte:** Adaptado de ZAIDI; DAY; MERLINO (2008)

Quando detectado precocemente, o melanoma maligno apresenta altos percentuais de cura; entretanto, estágios avançados desta doença além de dificultar a cura, proporcionam um mau prognóstico (INCA, 2016).

O melanoma apresenta mecanismos complexos de patogenicidade, os quais são consequência de alterações genéticas específicas relacionadas à proliferação, diferenciação e sobrevivência

celular (CURTIN et al., 2005). Um dos mecanismos mais estudados em relação ao melanoma é a cascata da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) que é responsável por mediar a resposta celular a estímulos extracelulares quanto ao crescimento, sobrevivência e proliferação das células de melanoma (PALMIERI et al., 2015).

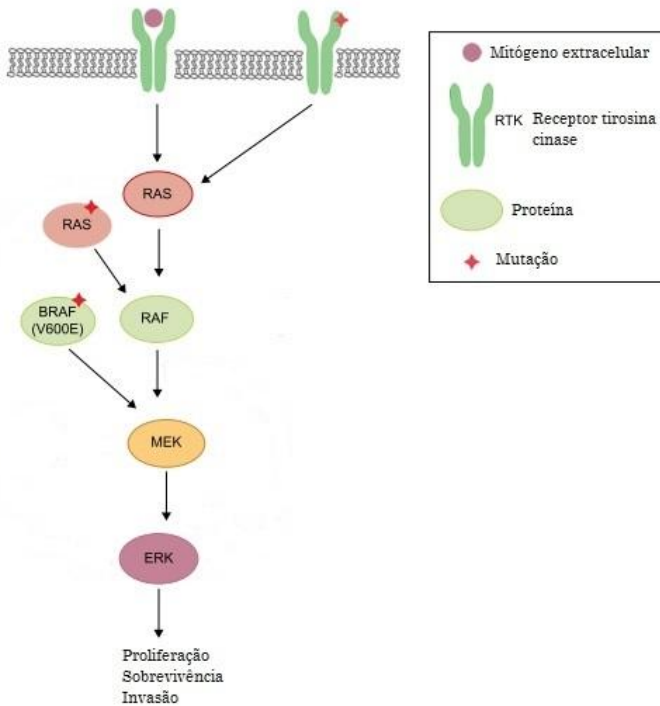
### **2.1.1. Cascata das MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno**

A transdução de sinais permite que as células percebam alterações no microambiente em que se encontram e respondam a estes sinais de forma apropriada. Como citado anteriormente, a cascata das MAPK está entre os sistemas de transdução de sinais mais estudados e é responsável por participar de uma grande variedade de respostas celulares, incluindo diferenciação, divisão e morte celular. Nos últimos anos, muitas terapias para o tratamento do melanoma obtiveram sucesso ao direcionarem o alvo na cascata das MAPK, a qual é um regulador crítico na proliferação e sobrevivência celular, além de facilitar a migração e angiogênese de células malignas (SCHAEFFER; WEBER, 1999; TRAN et al., 2001; DHILLON et al., 2007; KEE; MCARTHUR, 2014).

A cascata das MAPK é composta por módulos que incluem a cinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (ERK 1/2), a qual regula preferencialmente o crescimento e a diferenciação celular; assim como a cinase Jun amino terminal (JNK) e p38 MAPK, que atuam principalmente em resposta a estresse como inflamação e apoptose celular (SCHAEFFER E WEBER, 1999; SUN et al., 2016). Esta via de sinalização é ativada por diversos estímulos extra e intracelulares, incluindo fatores de crescimento, citocinas e hormônios que levam à fosforilação da MAPK pela proteína cinase cinase ativada por mitógeno (MAP2K), a qual é ativada pela proteína cinase cinase cinase ativada por mitógeno (MAP3K), ativando, assim, as proteínas RAS, RAF, MEK e ERK (SCHAEFFER; WEBER, 1999).

Alterações na cascata RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK vêm sendo reportadas em aproximadamente 25 % de diversos tipos de câncer (CASTELLANO; DOWNWARD, 2011). A maioria dos tipos de melanoma apresenta uma característica em comum, a ativação desta cascata de sinalização a qual acontece em 80 % dos casos (HAYDN et al., 2014). Destes, aproximadamente 60 % apresentam mutações no oncogene B-RAF e 20 % em N-RAS (RIBAS; FLAHERTY, 2011).

**Figura 5.** Cascata das MAPK



**Fonte:** Adaptado de SHI; OLNEY; KLOXIN (2016)

A família das GTPases (enzimas capazes de hidrolisar o GTP [guanosina trifosfato]) RAS é composta por H-RAS, N-RAS e K-RAS; e a RAF é composta por A-RAF, B-RAF e C-RAF, sendo que as mutações mais frequentes, como já citado, ocorrem em N-RAS e B-RAF (CASTELLANO; DOWNWARD, 2011). O ponto mais comum de sofrer mutação em B-RAF acontece no códon 600, que ocasiona substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico, denominada mutação V600E (LEE; CHOI; KIM, 2011). Já em N-RAS, a mutação ocasionada no códon 61 gera substituição de glutamina por arginina, denominada de mutação Q61R (GORDEN et al., 2003; LEE; CHOI; KIM, 2011).

A mutação V600E de B-RAF demonstrou, *in vitro*, uma atividade aproximadamente 500 vezes maior do que B-RAF não mutada em relação à fosforilação da cascata das MAPK (WAN et al., 2004). Em



nível celular, esta mutação promove proliferação e transformação de melanócitos em células de melanoma (GARNETT; MARAIS, 2004).

## 2.2. MICROAMBIENTE TUMORAL E MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR

Há muito tempo o câncer tem sido considerado como uma doença que consiste da alteração na capacidade de proliferação, invasão e sobrevivência de uma única célula mutada. Portanto, terapias antitumorais concentraram-se no tratamento apenas destas células. Entretanto, nas últimas décadas, evidências demonstram que para que se obtenha um tratamento mais eficaz contra o câncer, é necessário considerar esta doença como um sistema complexo envolvendo diferentes tipos celulares e proteínas inflamatórias que compõem o tecido tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LORUSSO; RÜEGG, 2008).

Em outras palavras, os tumores sólidos são mais que apenas uma massa de células cancerígenas que apresentam alta taxa de proliferação; estes tumores são tecidos complexos compostos por múltiplos tipos celulares que facilitam a interação entre as células do tumor. A este tecido, dá-se o nome de estroma associado ao tumor, o qual participa ativamente na carcinogênese, promovendo aumento da capacidade proliferativa das células, além de evadir os mecanismos supressores tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O microambiente tumoral é basicamente composto por células endoteliais e suas precursoras, fibroblastos, fibroblastos associados ao tumor, miofibroblastos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos T e B, células *natural killer*, células dendríticas e células apresentadoras de antígenos, como macrófagos, e citocinas pró-inflamatórias. Este microambiente é caracterizado por falta de nutrientes, mediadores inflamatórios e pH baixo. Isto faz com que se crie uma pressão atraindo células capazes de manter a proliferação das células tumorais e protegê-las de sofrerem apoptose (BEDOGNI et al., 2008), ou seja, participam ativamente da inflamação crônica local, facilitando o desenvolvimento de células tumorais (COUSSENS; WERB, 2002).

Os macrófagos representam a defesa inata primária do organismo e participam de funções importantes como a ativação de linfócitos ao apresentar antígenos. Além disso, são responsáveis pela produção de citocinas e eliminação de patógenos. Mas, devido a sua heterogeneidade, os macrófagos podem desempenhar funções supressoras (RUTHERFORD; WITSELL; SCHOOK, 1993).

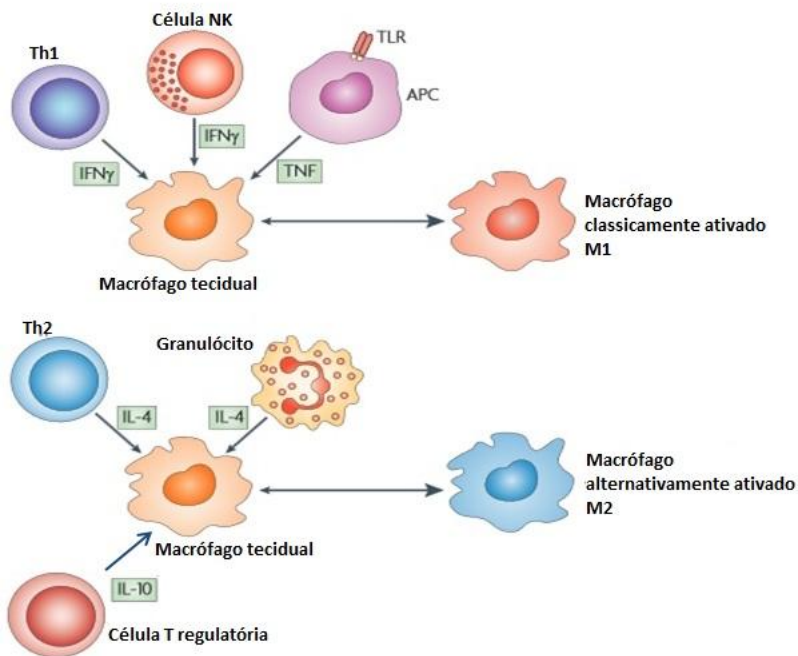
Embora a ação do sistema imunológico seja destruir células mutadas, a presença de infiltrados de mononucleares pode facilitar a progressão do tumor (GALDIERO, 2013). Sabe-se que os macrófagos apresentam alta capacidade de receber estímulos distintos do microambiente em que se encontram, podendo apresentar diferentes fenótipos. Macrófagos podem resultar em dois tipos opostos (figura 6), macrófagos M1 e M2 (COOK; HAGEMANN, 2013). Os macrófagos M1 surgem do estímulo de citocinas liberadas por Th1 (Linfócitos T helper 1), por exemplo, o interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Esta população de macrófagos apresenta funções clássicas do sistema imune, combatendo microrganismos e células tumorais. São capazes de liberar citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-6, além de alta capacidade de apresentação de antígenos (MANTOVANI et al., 2013). Já os macrófagos do tipo M2 são estimulados por glicocorticoides, fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13) e principalmente por interleucina 10 (IL-10), e são caracterizados por suprimir a ação da imunidade adaptativa mediada por Th1, participando, assim, de processos de inflamação, proteção contra parasitas, remodelamento tecidual e angiogênese (GORDON; TAYLOR, 2005; BISWAS; MANTOVANI, 2010).

Os macrófagos associados ao tumor (MAT) são polarizados a M2, e são o componente principal do infiltrado inflamatório em muitos tumores, além de serem responsáveis pela produção de inúmeros mediadores inflamatórios (quimiocinas) tornando-se de extrema importância na manutenção do processo inflamatório crônico no local do tumor (MANTOVANI et al., 1992; MANTOVANI et al., 2006).

Alguns estudos com modelos de carcinoma murino demonstraram claramente que os MAT são capazes de regular o remodelamento vascular tumoral. Para isto, os MAT produzem VEGF-A e sua superexpressão reverte parcialmente os efeitos da depleção de macrófagos (diminuição da angiogênese e da progressão de células tumorais) (LIN et al., 2007). Além disso, em alguns modelos tumorais, a produção de metaloproteinase 9 (MMP-9) por MAT facilita a ação de VEGF-A, originando uma via alternativa mas ainda dependente de VEGF na promoção da angiogênese (GIRAUDO; INOUE; HANAHAN, 2004).

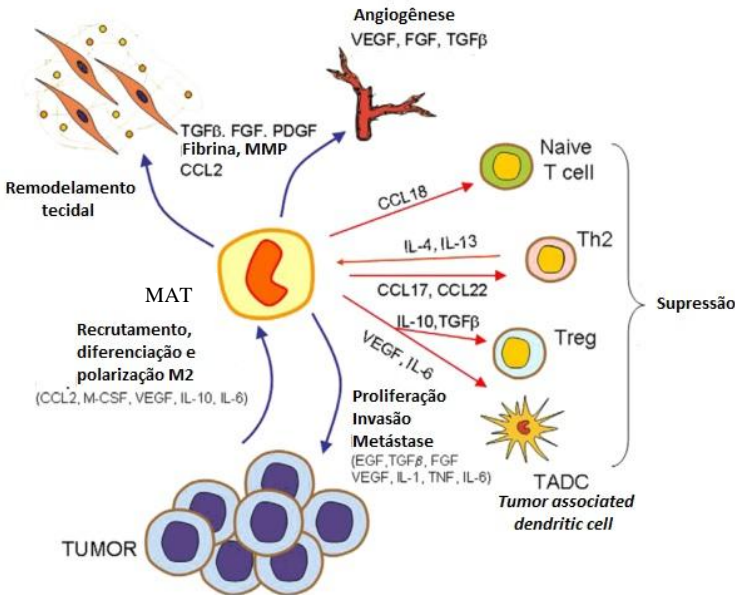
Estudos epidemiológicos evidenciam que tumores com infiltrados de MAT estão relacionados com um pior prognóstico em vários tipos diferentes de câncer, podendo antagonizar a eficácia da quimioterapia antitumoral (dependendo do tipo de tratamento e modelo tumoral) (BINGLE et al., 2002; DE PALMA; LEWIS, 2013).

**Figura 6.** Polarização de macrófagos



**Fonte:** Adaptado de MOSSER; EDWARDS (2008)

**Figura 7.** Microambiente tumoral



Funções pró-tumorais dos macrófagos M2. CCL2 (ou MCP-1), M-CSF e VEGF recrutam monócitos do sangue para o local do tumor, onde sofrerão polarização a M2. Os macrófagos associados ao tumor induzem angiogênese através da liberação de VEGF, FGF e quimiocinas. Além disso, degradam e remodelam a matriz extracelular pela ativação de MMP.

(M-CSF: fator estimulante de colônias de macrófagos; CCL2 (MCP-1): fator quimiotático de macrófagos; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; FGF: fator de crescimento de fibroblastos; TGF: fator de crescimento transformador; MMP: metaloproteinases; EGF: fator de crescimento epidermal; TADC: células dendríticas associadas ao tumor; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas).

**Fonte:** Adaptado de SICA; ALLAVENA; MANTOVANI (2008)

### 2.2.1. Inflamação e melanoma

Em situação de homeostase, as células imunes são responsáveis por manter a integridade dos tecidos e órgãos. Ao surgir alguma lesão, por exemplo, infecção por patógenos ou trauma físico, os leucócitos residentes limitam o dano enquanto ativam programas reparadores teciduais (ativação de fibroblastos e contração de vasos sanguíneos para ressintetizar a matriz tecidual; angiogênese; recrutamento de leucócitos do sangue periférico a fim de remover células defeituosas e debris);

seguido da resolução do dano, na qual o tecido volta à homeostase (SHIAO et al., 2011).

Lesões cutâneas iniciam uma cascata de eventos incluindo inflamação e remodelamento tecidual que levam à reparação da lesão. A resposta inflamatória ocorre em três estágios: dilatação dos capilares para aumentar o fluxo sanguíneo local; alterações estruturais microvasculares a fim de extravasar proteínas da circulação sanguínea para o local da inflamação; e transmigração leucocitária através do endotélio vascular, acumulando-se no local do dano. Além de funções de defesa do hospedeiro, células inflamatórias atuam como fonte importante na liberação de citocinas (como IL-1 e TNF- $\alpha$ ) e fatores de crescimento, que são necessários para o recrutamento celular, ativação e proliferação (NICKOLOFF; BEN-NERIAH; PIKARSKY, 2005).

Os mecanismos pelos quais a inflamação crônica torna-se um fator importante no surgimento de células tumorais incluem indução de instabilidade genômica, alterações em eventos epigenéticos e subsequente expressão gênica inapropriada, aumento de proliferação celular, resistência à apoptose, potencial de replicação celular ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase (COLOTTA et al., 2009; LANDSKRON et al., 2014).

A associação entre o desenvolvimento tumoral e inflamação já vem sendo estudada desde 1863, quando Rudolf Virchow notou a presença de leucócitos em tecidos neoplásicos, sugerindo a origem de células tumorais em locais de inflamação crônica (BALKWILL; MANTOVANI, 2001).

Estudos recentes demonstram que a inflamação é um componente crítico na progressão tumoral, sendo considerada um pré-requisito e não uma consequência do desenvolvimento do câncer (FAN et al., 2013; MARU; GANDHI; RAMCHANDANI, 2014) Muitos tipos de câncer surgem em locais de infecção, irritação crônica e inflamação (COUSSENS; WERB, 2002; BALKWILL; COUSSENS, 2004; DEL PRETE et al., 2011).

Estima-se que infecções e respostas inflamatórias estejam relacionadas a 15-20 % de todas as mortes causadas por câncer no mundo (LU, 2006; PARKIN, 2006; MANTOVANI et al., 2008). Muitas condições clínicas como lúpus eritematoso discoide, epidermólise bolhosa distrófica e locais com feridas crônicas estão associadas com inflamação cutânea e podem predispor o indivíduo a um aumento na susceptibilidade de desenvolver câncer de pele (NICKOLOFF; BEN-NERIAH; PIKARSKY, 2005).

Existem duas vias que conectam inflamação com câncer: a via intrínseca e a extrínseca. A primeira é ativada por eventos genéticos que causam neoplasia, incluindo a ativação de oncogenes (H-RAS, N-RAS, B-RAF) por mutação, rearranjo cromossomal ou amplificação, e inativação de genes supressores tumorais (p53, p16/INKA4 [inibidor dependente de ciclina 2A]) (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As células transformadas desta maneira produzem mediadores inflamatórios responsáveis por gerar um microambiente inflamatório em tumores. Além disso, há outros mediadores frequentemente observados em câncer de pele, como as proteínas *patched* 1 e 2 (PTCH1, PTCH2), proteína *sonic hedgehog* (Shh), cinase dependente de ciclina 4 e 6 (CDK4, CDK6), receptor de melanocortina 1 (MC1R), citocromo p450 (CYP), Ras, e proteína tumoral 53 (TP53). Os genes envolvidos no surgimento de câncer de pele induzido por radiação UV incluem o gene supressor tumoral p53, PTCH e oncogenes Ras (HOCKER; SINGH; TSAO, 2008; MADAN; LEAR; SZEIMIES, 2010).

Em contraste, a via extrínseca representa a ação de leucócitos e mediadores inflamatórios, radiação UV, lesão tecidual e estresse oxidativo que levam a condições que predispõem o surgimento do câncer. As duas vias em conjunto resultam na ativação de fatores de transcrição, principalmente fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), fator de transcrição e ativação 3 (STAT3) e fator indutor de hipóxia 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) em células tumorais. Estes fatores coordenam a produção de mediadores pró-inflamatórios incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, fator quimiotático de macrófagos 1 (MCP-1) também chamado de CCL-2, e também a produção de ciclooxigenase 2 (COX-2) a qual resulta na produção de prostaglandinas (PG) (MANTOVANI et al., 2008; DEL PRETE et al., 2011).

Citocinas pró-inflamatórias, importantes mediadores da inflamação, apresentam papéis distintos no desenvolvimento do câncer de pele juntamente com óxido nítrico (NO) agindo como mensageiros celulares e auxiliando na ativação de NF- $\kappa$ B (KUNDU; SURH, 2008). O NF- $\kappa$ B e STAT3 são os mais importantes fatores de transcrição das vias inflamatórias e apresentam funções fundamentais na carcinogênese por estarem constitutivamente ativados na maioria dos cânceres, incluindo melanoma. Além disso, a maioria dos genes ligados à inflamação, sobrevivência, proliferação, invasão, angiogênese e metástase é regulada por estes dois fatores de transcrição (AGGARWAL; VIJAYALEKSHMI; SUNG, 2009).

Muitos estímulos podem induzir a ativação de NF- $\kappa$ B, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS, radiação UV, espécies reativas de oxigênio (ROS) e

alguns microrganismos relacionados à pele, como *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* e herpes simplex vírus (HSV) (BELL et al., 2003; PAHL, 1999). Diversos genes dependentes de NF- $\kappa$ B presentes na pele são essenciais para a iniciação da inflamação cutânea, incluindo genes de diferentes citocinas, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1). Este fator de transcrição também regula enzimas pró-inflamatórias, como óxido nítrico sintase (iNOS) e COX-2, que estão envolvidas na inflamação crônica da pele e posteriormente na carcinogênese de células cutâneas. Adicionalmente, NF- $\kappa$ B controla a expressão de genes relacionados à inibição da apoptose (Bcl-2), proliferação (ciclina), invasão, angiogênese e metástase (MMP, VEGF). Baseado nisso, este fator de transcrição é fortemente associado ao processo de carcinogênese (PRASAD; RAVINDRAN; AGGARWAL, 2010; ZHU et al., 2011).

As proteínas STAT são ativadas por sinais extracelulares, fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF), e citocinas, como IL-6. Estas proteínas regulam a expressão de genes mediadores de sobrevivência celular (Bcl-x1), proliferação (c-fos, c-myc), invasão (MMP-2) e angiogênese (VEGF) (AGGARWAL; VIJAYALEKSHMI; SUNG, 2009). A manutenção da ativação de NF- $\kappa$ B em tumores requer a ação de STAT3 a qual está constitutivamente ativada tanto em tumores quanto em células do sistema imune, participando do processo de carcinogênese (COLOTTA et al., 2009).

### **2.2.1. Citocinas pró-inflamatórias**

Alguns mediadores inflamatórios estão entre os responsáveis pela iniciação e progressão de tumores. Entre eles, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que está envolvido em situações de doenças inflamatórias crônicas, apresenta efeito que parece ser mais significativo nos estágios iniciais da carcinogênese, incluindo angiogênese e invasão (MOORE et al., 1999; BALKWILL; COUSSENS, 2004; BALKWILL, 2006; MUELLER, 2006; MANTOVANI et al., 2008; SZLOSAREK, CHARLES). O TNF- $\alpha$  estimula a secreção de metaloproteinase 2 (MMP-2), uma enzima que ativa a colagenase do tipo IV, facilitando angiogênese e invasão de células tumorais. Esta citocina demonstrou aumentar a malignidade de células de melanoma *in vitro* facilitando a invasão e migração (HAN et al., 2001; KATERINAKI et al., 2003).

A interleucina 6 (IL-6) também é uma proteína inflamatória estimulada por radiação UV em queratinócitos (CHUNG et al., 1996). Apresenta papel importante na progressão de células benignas em

malignas através da ativação de STAT3, além de induzir fatores inflamatórios e angiogênicos como interleucina 8 (IL-8) e VEGF, e MCP-1 em células tumorais, promovendo invasão de células tumorais *in vitro*. A invasão tumoral, neste caso, é ocasionada pela superexpressão de metaloproteinase 1 (MMP-1), demonstrando a função da IL-6 na progressão do melanoma (LEDERLE et al., 2011).

Interleucina 1 (IL-1) é outra importante citocina secretada por monócitos e macrófagos, acarretando em inflamação aguda. Muitas células são capazes de secretar IL-1 após estímulo de microrganismos, citocinas e do microambiente em que se encontram. A IL-1 $\alpha$  ativa a liberação de IL- $\beta$  em células adjacentes, induzindo a expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo de IL-6, COX-2 e iNOS (APTE et al., 2006). Estudos demonstram que camundongos, ao superexpressarem IL-1 $\alpha$ , desenvolveram lesões cutâneas e infiltrados leucocitários até em tecido cutâneo sem nenhuma lesão (GROVES et al., 1995). Adicionalmente, a superexpressão de antagonistas de IL-1 (IL-1Ra) em linhagem de melanoma murino, diminuiu a expressão de COX-2 e desacelerou o crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo*. Estes resultados indicam que IL-1 contribui na proliferação de células tumorais (RUNDHAUG; FISCHER, 2010).

A proteína amiloide sérica A (SAA) humana é uma lipoproteína de alta densidade conhecida por modular processos de inflamação e participar do metabolismo e transporte de colesterol (YAMADA, 1999). É sintetizada principalmente pelo fígado através da regulação de citocinas durante inflamação aguda e crônica. A SAA é considerada proteína de fase aguda mais sensível que a proteína C reativa (PCR), e seus altos níveis estão relacionados à morte celular e tecidual, portanto, em casos de inflamação severa (YAMADA, 2006). Estudos demonstram que a SAA é um potente indutor de liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (CAI et al., 2007; FURLANETO; CAMPA, 2000). A concentração desta lipoproteína também está relacionada ao prognóstico de doenças inflamatórias e avaliação de estágios do câncer, sugerindo que a SAA pode ser utilizada como monitoramento do desenvolvimento e progressão tumoral (HILLIQUIN, 1995; RAU; SCHILLING; BEGER, 2004; RAU, 2007; MOFLEH, 2008).

Além da conexão com citocinas, outras vias inflamatórias também levam à formação de mediadores que podem contribuir para a progressão do câncer. Entre estas vias, o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) aparece como uma via de sinalização



crítica capaz de receber estímulos diversos e gerar impacto na progressão do câncer (BERASAIN et al., 2009).

O EGFR, também conhecido como ErbB1, é uma glicoproteína transmembrana caracterizada pela presença de um sítio de ligação extracelular. Além disso, o EGFR apresenta uma família de quatro receptores transmembrana, EGFR (ou ErbB1), o ErbB2, ErbB3 e ErbB4 (SIBILIA et al., 2007; SHEPARD et al., 2008). Estes receptores estão desregulados em muitos tumores, e a amplificação, aumento da expressão e mutação do EGFR, são detectadas em uma grande quantidade de carcinomas (SIBILIA et al., 2007).

Uma grande quantidade de fatores de crescimento ligam-se nos receptores ErbB, com exceção do ErbB2, o qual não foi identificado nenhum ligante específico. Estes fatores incluem o EGF, TGF- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor- $\alpha$* ), AR (Ampirregulina), EREG (Epirregulina),  $\beta$ -TC ( $\beta$ -celulina), EPG (Epígeno) e HB-EGF (EGF ligado à heparina). Estes ligantes apresentam um sítio de ligação semelhante ao EGF, definindo assim, a especificidade com o receptor (BERASAIN et al., 2009).

Sabe-se que a expressão destes ligantes torna-se elevada em situações de dano celular e inflamação em diferentes órgãos e tecidos. O aumento desta expressão pode levar à formação de células malignas promovendo migração e invasão das mesmas (SCHAFER; GSCHWIND; ULLRICH, 2004).

Algumas citocinas como MCP-1, TNF- $\alpha$ , SAA, IL-6 e IL-1 $\beta$  além de outras, estão fortemente relacionadas à obesidade (WOZNIAK et al., 2009). O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino capaz de produzir hormônios, fatores de crescimento e citocinas (adipocinas) que são capazes de atrair monócitos (RAJALA; SCHERER, 2003) criando um ambiente favorável ao surgimento de células tumorais (PISCHON; NOTHLINGS; BOEING, 2008; GILBERT; SLINGERLAND, 2013).

### 2.3. INFLAMAÇÃO E OBESIDADE

A obesidade e sobrepeso são definidos por acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, comprometendo a saúde do indivíduo. A medida utilizada para avaliar a obesidade é o índice de massa corporal (IMC) que é calculado através da divisão da massa do indivíduo (em quilogramas) por sua altura ao quadrado (em metros). Um indivíduo com IMC acima de 30 kg/m<sup>2</sup> é considerado obeso, enquanto que IMC entre 25 e 30 kg/m<sup>2</sup> caracteriza sobrepeso (WHO, 2016).

Obesidade é considerada como um dos principais fatores que levam ao surgimento de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (WHO, 2016). O percentual de pessoas com excesso de peso já ultrapassa a metade da população brasileira, e em relação à obesidade, este percentual é de aproximadamente 18 % (BRASIL, 2015).

Em adultos, o tecido adiposo é quase completamente tecido adiposo branco que atua como depósito de gordura e fonte de energia. O tecido adiposo branco é capaz de produzir hormônios e citocinas, chamadas de adipocinas (AHIMA; FLIER, 2000). Até recentemente acreditava-se que as citocinas do tecido adiposo eram secretadas apenas por macrófagos. Agora sabe-se que pré-adipócitos do tecido adiposo branco produzem uma vasta quantidade de citocinas e fatores de crescimento. Entre elas, estão a leptina, o TNF- $\alpha$ , o TGF- $\beta$ , VEGF, IL-1 $\beta$ , IL-6, adiponectina e resistina (AHIMA; FLIER, 2000; LABRIE; LUU; LABRIE, 2000). Estas citocinas secretadas por pré-adipócitos atraem monócitos, e altas concentrações de leptina promovem a conversão destas células em macrófagos, contribuindo para a inflamação local e produção de fatores angiogênicos (VONA-DAVIS; ROSE, 2009).

Este microambiente inflamatório no tecido adiposo provoca uma via de *feedback* positivo na progressão do câncer, uma vez que a IL-6 e MCP-1 atraem monócitos, a leptina facilita a conversão para macrófagos, aumentando a produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios (VONA-DAVIS; ROSE, 2009; ROBERTS; DIVE; RENEHAN, 2010).

### **2.3.1. Melanoma e obesidade**

Desde a década de 50, a exposição à radiação UV é considerada o fator de risco elementar para o surgimento do melanoma maligno (ADAMI et al., 2008). Além disso, como já citado, indivíduos caucasianos apresentam maior chance de desenvolver este tipo de câncer; a presença de nevos e situação de imunossupressão também facilitam o surgimento desta doença (GANDINI et al., 2005A ; GANDINI et al., 2005B; VAJDIC et al., 2006; ADAMI et al., 2008; OLSEN et al., 2011; CHANTZINASIOU et al., 2011).

A incidência de obesidade e de melanoma vem aumentando nos últimos anos. Uma elevada massa corporal foi associada com o aumento das ocorrências de melanoma em diversos estudos epidemiológicos (SAMANIC, 2004; OH; YOON; SHIN, 2005; MANTZOROS et al.,

2007; DENNIS et al., 2008; RENEHAN et al., 2008; GOGAS et al., 2008).

A obesidade já é estabelecida como fator de risco para diversos tipos de câncer, sendo que é considerada responsável pelo surgimento de, aproximadamente, 20 % de todos os casos de câncer (WOLIN; COLDITZ, 2008; DE PERGOLA; SILVESTRIS, 2013).

Os principais tipos de câncer que podem se desenvolver em situação de obesidade são de cólon (NING; WANG E GIOVANUCCI, 2010), endométrio (CROSBIE et al., 2010), renal (RENEHAN et al., 2008; (WOLIN; CARSON; COLDITZ, 2010), câncer de mama pós menopausa (WOLIN; CARSON; COLDITZ, 2010), esôfago (RENEHAN et al., 2008) , tireóide (RENEHAN et al., 2008; WOLIN; CARSON; COLDITZ, 2010), próstata (DISCACCIATI; ORSINI; WOLK, 2012) e possivelmente algumas malignidades hematológicas (LICHTMAN, 2010).

Uma meta-análise de 2013 relacionou alguns estudos a fim de verificar se há uma relação entre obesidade e melanoma. Foram associados dois casos-controle e estudos de coorte, os quais demonstraram um aumento no risco de surgimento de melanoma em indivíduos do gênero masculino com sobrepeso e considerados obesos, na mesma magnitude (SERGENTANIS et al., 2013).

Estudos sugerem que alterações nas concentrações de leptina, em situação de obesidade, estão associadas com uma resposta inflamatória exacerbada à radiação UV. É possível que isto contribua para a carcinogênese cutânea (SHARMA; KATIYAR, 2010).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer conexões entre a inflamação e a progressão de três linhagens celulares de melanoma em relação aos seus aspectos proliferativos, migratórios e invasivos, e correlacionar à inflamação provocada em situação de obesidade.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar a capacidade de clonogenicidade de três linhagens celulares de melanoma (SK-mel-19; SK-mel-28 e SK-mel-147) após o tratamento com citocinas (TNF- $\alpha$  e EGF);
- b) Avaliar a capacidade migratória de três linhagens celulares de melanoma (SK-mel-19; SK-mel-28 e SK-mel-147) frente ao estímulo de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e EGF);
- c) Avaliar possíveis alterações no ciclo celular das três linhagens celulares de melanoma (SK-mel-19; SK-mel-28 e SK-mel-147) frente a estímulos inflamatórios (TNF- $\alpha$  e EGF);
- d) Investigar possíveis alterações na expressão gênica de proteínas relacionadas ao aumento da capacidade proliferativa, migratória e invasiva de células de melanoma (B-RAF e N-RAS) quando tratadas com citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e EGF);;
- e) Padronizar a co-cultura direta de células de melanoma (SK-mel-28) com mononucleares isolados do sangue periférico (PBMC);
- f) Quantificar citocinas (IL-1 $\beta$ , MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) no sobrenadante da co-cultura direta de melanoma com PBMC;
- g) Avaliar a capacidade migratória de uma linhagem de melanoma (SK-mel-28) após estímulo com soro de indivíduos obesos e magros;
- h) Investigar alterações na expressão gênica de proteínas da via das MAPK (B-RAF e N-RAS) nas linhagens de melanoma (SK-mel-28) após estímulos inflamatórios diversos (citocinas: IL-1 $\beta$ , MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , SAA) e soro dos indivíduos obesos e magros).

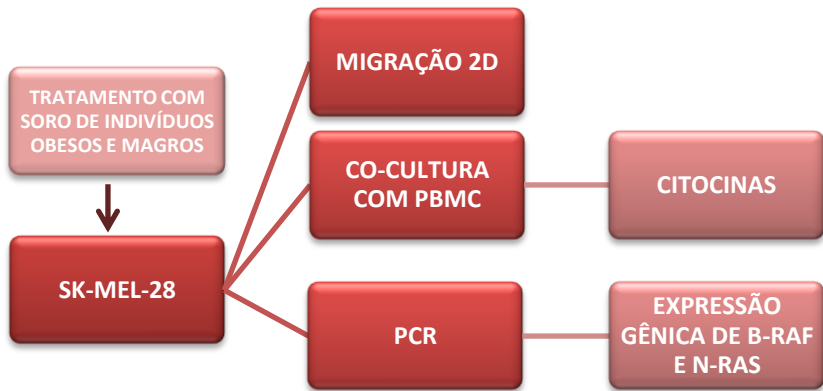


#### 4. FLUXOGRAMA DE EXPERIMENTOS

Figura 8. Primeira etapa:



**Figura 9.** Segunda etapa:





## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. PRIMEIRA ETAPA – INFLAMAÇÃO COM CITOCINAS

#### 5.1.1. Células e condições de cultura

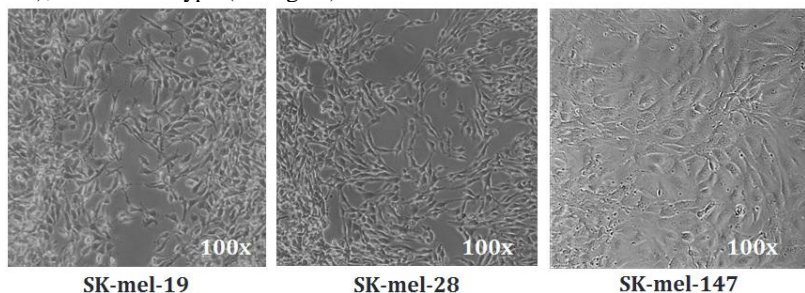
##### 5.1.1.1. Linhagens celulares

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens humanas SK-mel-19, SK-mel-28 e SK-mel-147, cedidas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Campa, da Universidade de São Paulo. As características destas linhagens estão descritas na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Características das linhagens celulares de melanoma

Linhagem Celular	Mutação B-RAF / N-RAS	Descrição	Origem	Característica
SK-MEL-19	V599E <sup>1</sup> / WT	Melanoma	Homo sapiens	Amelanótica/ Não metastática <sup>2</sup>
SK-MEL-28	V600E <sup>3</sup> / WT	Melanoma	Homo sapiens	Levemente melanótica
SK-MEL-147	WT <sup>0</sup> / Q61R <sup>4</sup>	Melanoma	Homo sapiens	Amelanótica

**Notas:** <sup>1</sup>V599E: alteração em B-RAF no éxon 15: T1796A, ocasionando substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico no códon 599 (DAVIES et al. 2002; GORDEN et al. 2003); <sup>2</sup>V600E: mutação em B-RAF no éxon 15: T1799A, acarretando substituição de valina por ácido glutâmico no códon 600 (LEE, CHOI E KIM 2011); <sup>3</sup>Q61R: mutação no códon 61, originando substituição de glutamina por arginina (GORDEN et al. 2003; LEE, CHOI E KIM 2011); <sup>0</sup>WT: Wild type (selvagem).



**Fonte:** do autor.

### 5.1.1.2. Cultivo celular

As linhagens de melanoma foram cultivadas em garrafas adequadas para a cultura celular, com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (pH 7,4), enriquecido com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de HEPES, mantidas em estufa umidificada, a 37 °C, em atmosfera de 5 % de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Estas células foram subcultivadas ao atingirem a confluência de 80%, sendo lavadas com tampão PBS (1x) e, após a lavagem, utilizou-se tripsina para dissociação celular. Estoques celulares foram mantidos em DMEM acrescido de 40 % de SFB e 10 % DMSO (ácido dimetilsulfóxido), em reservatório de nitrogênio líquido, o qual mantém uma temperatura aproximada de -180 °C.

Para realizar os experimentos, as células apresentavam de 80 a 90% de confluência e foram contadas com a adição de azul de tripan, a fim de verificar a viabilidade celular. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer. As células não foram submetidas a mais do que 10 passagens celulares.

Todos os reagentes utilizados constam no apêndice A deste trabalho.

### 5.1.2. Tratamento com citocinas

Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo três poços para cada tratamento, controle sem tratamento; TNF- $\alpha$  (25 e 50 pg/mL); EGF (100 ng/mL); MCP-1 (25 pg/mL); IL-1 $\beta$  (10 pg/mL); IL-6 (10 pg/mL); SAA (75 ng/mL).

### 5.1.3. Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico é uma técnica que foi primeiramente citada em 1956 por Puck e colaboradores, e é baseada na avaliação da capacidade de reprodução celular, sendo necessário que de apenas uma célula se forme uma colônia de, no mínimo, 50 células.

Este ensaio foi realizado baseando-se no protocolo de Rafehi e colaboradores (2011). Fez-se uma suspensão das células aderidas e previamente mantidas em meio de cultura apropriado nas condições citadas anteriormente. As células foram soltas com tripsina, ressuspendidas em DMEM enriquecido com 10 % de SFB, contadas na câmara de Neubauer com auxílio de azul de tripan, em microscópio de luz invertido. Foram plaqueadas 300 células/poço em placa de 6 poços e incubadas em estufa durante 24 horas, para permitir a adesão das células

na placa. Após este período, as células foram tratadas com as proteínas inflamatórias: o TNF- $\alpha$  (50 pg/mL) e EGF (100 ng/mL).

Após sete dias do tratamento, o sobrenadante foi descartado, as células foram fixadas com formalina 10 % e coradas com GIEMSA. As colônias foram contadas com auxílio do *software* ImageJ®.

#### **5.1.4. Ensaio de migração 2D (Scratch Assay)**

Este ensaio, também chamado de *Scratch assay* ou *Wound Healing assay*, é realizado para avaliar a capacidade de migração das células estudadas. Foi realizado em condições estéreis, plaqueando-se 300.000 células/poço em placa de 12 poços. As células foram mantidas em DMEM + 10 % SFB por aproximadamente 24 horas, ou até formarem 90 % de confluência.

Após este período, foi feita uma fenda em monocamada em cada poço com auxílio de uma ponteira de 200  $\mu$ L. Cada poço foi lavado com PBS 1x para eliminar as células soltas, e então adicionou-se DMEM sem SFB juntamente com o tratamento com as citocinas. O soro fetal bovino é composto por uma vasta quantidade de nutrientes e fatores de crescimento, os quais favorecem a proliferação das células. Isto afeta a verificação da capacidade de migração das mesmas frente ao estímulo inflamatório das citocinas. Portanto, as células, após 24 h com DMEM + 10 % SFB, foram mantidas em DMEM sem SFB, com o tratamento específico para cada poço.

Neste momento, foram tiradas fotos relativas ao tempo 0 h do experimento. Após 24 h e 48 h, fotos foram tiradas do mesmo local do poço a fim de comparar com o tempo 0 h e calcular a porcentagem de migração destas células, com o auxílio do *software* ImageJ®.

#### **5.1.5. Análise do ciclo celular**

O ciclo celular é um processo extremamente regulado que envolve múltiplos pontos de checagem a fim de garantir a integridade do DNA celular para a replicação das células. Este ciclo é dividido em quatro fases; na fase S, a célula executa funções básicas para a divisão celular, como a formação de uma cópia idêntica do material genético, e após isto, ocorre a separação de todos os componentes celulares em duas células exatamente iguais, fase chamada de mitose. As duas outras fases são chamadas de gap (G1 e G2), nas quais as células preparam-se para completar de forma perfeita as fases S e M, respectivamente. Além destas quatro fases, há a etapa de quiescência (G0), na qual a célula cessa a proliferação e permanece indefinidamente em intérfase (PARK; LEE, 2002).

Neste ensaio, as células foram marcadas com iodeto de propídio, um corante fluorescente que quando intercalado ao DNA permite a análise deste conteúdo através de citometria de fluxo. Para a realização desta análise, utilizou-se o método descrito por Yang e colaboradores (2007) em que as células (300.000/poço) foram incubadas com meio de cultura apropriado em placa de 12 poços, por 24 horas para adesão das células na placa. Em seguida, foi realizado o tratamento com as citocinas. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido, as células tripsinizadas foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 25 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Nessa etapa, o sobrenadante foi novamente removido, adicionou-se etanol 70 % seguido de incubação por 30 min a - 4 °C para fixação das células. O PBS contendo BSA 2 % foi adicionado para inibir ligações inespecíficas com o iodeto de propídio, seguido de centrifugação a 1500rpm por 10 minutos a 25 °C. Descartado o sobrenadante, adicionou-se uma solução contendo RNase 100 µg/ml, 0,1 % de Triton-X-100 em PBS, homogeneizado e transferido para tubos específicos para citometria de fluxo, que foram mantidos em gelo até a leitura. No momento da análise, as células foram marcadas com 10 µg/ml de iodeto de propídio. A análise do DNA foi realizada por meio de um citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences) e a população de células que corresponde a cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando-se o *software* Flowing® 2.5.1.

#### **5.1.6. Separação de mononucleares (PBMC)**

A técnica para isolamento de mononucleares do sangue periférico foi realizada a partir do protocolo adaptado do Ficcol-Histopaque®. Este reagente trata-se de um polissacarídeo que apresenta densidade de 1,077 g/mL, e foi utilizado no isolamento destas células da seguinte forma: aproximadamente 12 mL de sangue total foram coletados em tubo de EDTA. Este sangue foi diluído em proporção 1:1 em PBS em um falcon de 50 mL. Em outro falcon, adicionou-se Ficcol-Histopaque® em uma quantidade correspondente à metade do volume de sangue coletado. O sangue diluído em PBS foi, então, adicionado ao Ficcol vertendo-se o falcon a 30° vagarosamente sobre o solvente de modo que as duas fases não se misturem. Nesta etapa, centrifugou-se a 1500 rpm durante 10 min a 25 °C. Após esta centrifugação, observou-se a formação de uma nuvem celular entre os glóbulos vermelhos e o plasma. Esta nuvem de células foi separada e lavada com PBS, seguido de centrifugação a 1200 rpm durante 10 min. Para eliminar contaminações com hemácias, o

pellet formado foi levado a outro falcon e um tampão de lise de hemácias foi adicionado, e posteriormente centrifugado novamente.

Este tampão era composto por tris-cloreto de amônio, esterilizado a partir de filtro de 0,22 µm.

• Cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 115,4 mol/L) e Tris-base ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , 124,1 mol/L, pH 7,3). Adicionou-se uma parte de tris para 9 de cloreto de amônio no momento do uso.

Então, após esta centrifugação, o *pellet* formado apresentou células mononucleares do sangue periférico (PBMC), os quais foram contados em câmara de Neubauer com auxílio do azul de tripan para o posterior plaqueamento e a realização dos experimentos.

### **5.1.7. Co-cultura direta**

A co-cultura celular foi realizada com as linhagens de melanoma SK-mel-28 e PBMC. Para isto, fez-se necessário o plaqueamento da linhagem de melanoma, e após aproximadamente 24 h, foram adicionados os PBMC na proporção 1:2, melanoma:PBMC. Neste momento, os tratamentos foram adicionados em cada poço em triplicata.

### **5.1.8. Reação Imunoenzimática (ELISA)**

O ELISA foi realizado com o sobrenadante da co-cultura direta a fim de quantificar citocinas ( $\text{TNF-}\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  e IL-6), além de quantificar MCP-1 e SAA no soro dos indivíduos obesos e magros. As células permaneceram 24 h com os tratamentos. O protocolo utilizado foi de acordo com o fabricante do kit, BD Biosciences, o qual consiste no método de ELISA de captura a partir da adesão em placa de 96 poços do anticorpo monoclonal específico para cada citocina. Após a adesão, adicionou-se as amostras e a curva de calibração que permaneceram na placa com incubação de acordo com o fabricante. As lavagens necessárias foram realizadas com o tampão de lavagem e seguiu-se com a adição de anticorpo secundário anti citocina ligado à peroxidase. Após as lavagens necessárias, adicionou-se tetrametilbenzidina (TMB) que serve como substrato para a enzima peroxidase. A solução de parada foi adicionada e a intensidade da coloração do produto é diretamente proporcional à concentração de cada citocina nas amostras.

As curvas de calibração das citocinas constam no apêndice B.

## 5.1.9. Expressão gênica de B-RAF e N-RAS

### 5.1.9.1. Extração de RNA total

As células da linhagem SK-mel-28 aderidas na placa de 12 poços foram lavadas com PBS gelado e o RNA total foi extraído com TRIzol® (Gibco®). Em seguida, foi adicionado clorofórmio, para separação em fase aquosa e orgânica. As amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex durante 15 segundos, incubadas em temperatura ambiente e centrifugadas por 15 minutos a 12000 xg (4°C). A fase aquosa foi cuidadosamente coletada e transferida para um novo tubo no qual foi adicionado álcool isopropílico, seguido de incubação de 10 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se por 10 minutos a 12000 xg e o sobrenadante foi removido. O *pellet* (RNA) foi lavado com etanol 75 % e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 7500 xg (4 °C). O sobrenadante foi removido, o sedimento (RNA) foi seco em temperatura ambiente e dissolvido em água livre de RNase. O RNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro Nano Vue® (GE Healthcare), sua pureza foi avaliada em comprimento de onda de 260/280 nm e as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen™) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

### 5.1.9.2. Síntese de DNA complementar

Para a síntese do cDNA utilizou-se o kit High – Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems) conforme protocolo indicado pelo 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).

### 5.1.9.3. Reação de PCR em tempo real (qPCR)

Primeiramente, a fim de avaliar a eficiência da reação de PCR quantitativo, foi realizada uma curva de calibração com diferentes concentrações de cDNA, para todos os pares de iniciadores, com objetivo de determinar a eficiência dos iniciadores para a reação de quantificação relativa. A amplificação foi realizada utilizando-se Power SYBR-Green PCR Master Mix (Thermo Scientific®). Para a análise da expressão gênica através do *Real-Time* PCR, foi utilizado o método de Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Calcula-se inicialmente o  $\Delta Ct$  de cada amostra, subtraindo-se o valor de Ct do gene constitutivo (GAPDH) dos valores de Ct dos genes alvo (B-RAF e N-RAS). Após a determinação do  $\Delta Ct$ , foi escolhida a amostra controle

(sem tratamento) para o cálculo de  $\Delta\Delta Ct$ . Então aplica-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  resultando no valor da expressão relativa.

As curvas de eficiência dos primers utilizados na reação de PCR em tempo real constam no apêndice C.

**Tabela 2.** Iniciadores utilizados na reação de qPCR

	Sense ( 5'- 3')	Antisense ( 5'- 3')
<b>GAPDH</b>	CAATTGACCCCTTCATTGACC	GACAAGCTTCCCGTTCCG
<b>N-RAS</b>	ACAAACTGGTGGTGGTTGGA	ATTGTCAGTGCGCTTTTC
<b>B-RAF</b>	CTCCTTGAATCGGGCTGGTT	GCCTGGATGGGTGTTT

## 5.2. SEGUNDA ETAPA – INFLAMAÇÃO COM SORO DE INDIVÍDUOS OBESOS E MAGROS

### 5.2.1. Soro dos grupos obesos e magros

Nesta etapa, os experimentos foram realizados com meio de cultura celular DMEM suplementado com 10 % de soro de indivíduos obesos e magros. O soro derivado dos pacientes foi inativado a 56 °C por 30 minutos para todos os experimentos.

### 5.2.2. Caracterização dos indivíduos obesos e magros

Os pacientes selecionados pela equipe multidisciplinar do HU-UFSC para a cirurgia bariátrica no período de agosto/2014 a novembro/2014 foram convidados a participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, apêndice D). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade do Estado de Santa Catarina (24279013.7.0000.0121) (apêndice E).

A seleção dos pacientes se deu de acordo com os seguintes critérios:

Critérios de Inclusão: Pacientes entre 16 a 69 anos que se submetem à cirurgia bariátrica do tipo *ByPass* gástrico em Y de *Roux* no HU-UFSC.

Critérios de exclusão: pacientes com doenças infecciosas.

Também foram selecionados seis indivíduos considerados magros (IMC < 25 kg/m<sup>2</sup>) para servirem como comparação ao grupo de obesos, e seus dados constam na tabela a seguir:

### 5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios deste trabalho foram realizados em triplicata, com a repetição de três vezes em diferentes datas.

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão e analisados através do programa Graphpad Prism®. Após o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, observou-se que os resultados da primeira etapa (com citocinas) apresentava uma distribuição normal dos dados, possibilitando a análise de variância *One Way* ANOVA, com pós teste de Bonferroni, que são testes paramétricos. Esta análise foi utilizada nos ensaios clonogênico e ELISA, a fim de comparar os grupos tratados com o grupo controle (sem tratamento). E a *Two Way* ANOVA foi a análise realizada no ensaio de migração e ciclo celular comparando os grupos tratados com o controle em diferentes tempos de tratamento.

Para os ensaios envolvendo o soro de pacientes, as diferenças entre as medianas foram determinadas pelo teste não-paramétrico U de Mann-Whitney, pois os dados demonstraram-se em uma distribuição não normal. Valores de probabilidade menores ou iguais a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.



## 6. RESULTADOS

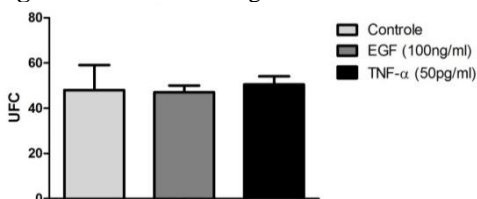
### 6.1. RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

#### 6.1.1. Ensaio clonogênico

##### 6.1.1.1. SK-mel-19

O ensaio para avaliar a capacidade de clonogenicidade das células de melanoma, com a linhagem SK-mel-19 estimulada com TNF- $\alpha$  (50pg/mL) e EGF (100ng/mL), não demonstrou diferença significativa quando comparados com o controle sem tratamento.

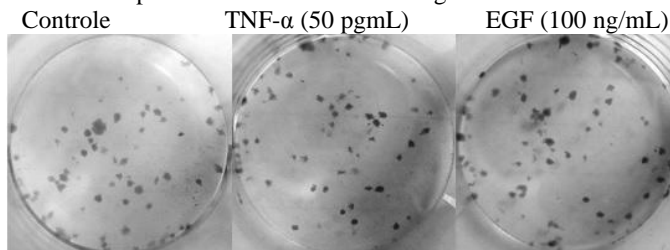
**Figura 10.** Ensaio clonogênico SK-mel-19.



Resultados expressos em média e desvio padrão. Controle sem tratamento; Células tratadas com EGF (100 ng/mL); Células tratadas com TNF- $\alpha$  (50 pg/mL). O gráfico mostra os grupos tratados comparados com o grupo controle, expresso em unidades formadoras de colônias (UFC)  $\pm$  desvio padrão. *One Way ANOVA*.

A Figura 11 demonstra as colônias formadas por células de melanoma, as quais foram contadas e comparadas com o grupo controle.

**Figura 11.** Fotos representativas do ensaio clonogênico

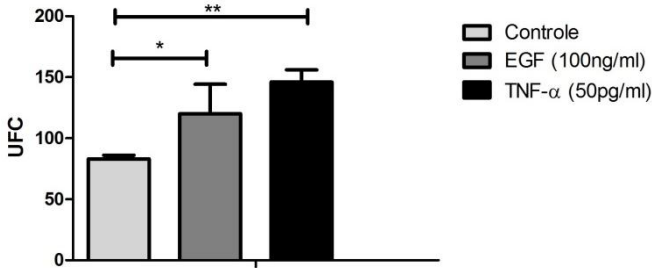


Fotos da SK-mel-19 após sete dias do tratamento. Células fixadas com formalina a 10% e coradas com GEMSA.

### 6.1.1.2. SK-mel-28

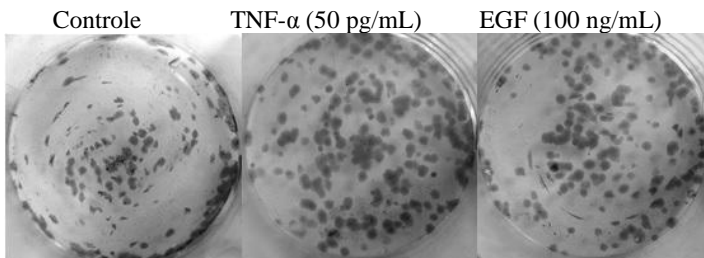
Este ensaio de clonogenicidade realizado com a linhagem de melanoma SK-mel-28 apresentou diferença significativa na capacidade de formação de colônias após os estímulos tanto com EGF e TNF- $\alpha$ , demonstrando a capacidade destas citocinas em aumentar a proliferação desta linhagem celular de melanoma humano.

**Figura 12.** Ensaio clonogênico SK-mel-28.



Resultados expressos em média e desvio padrão. Controle sem tratamento; Células tratadas com EGF (100 ng/mL); Células tratadas com TNF- $\alpha$  (50 pg/mL). O gráfico apresenta os grupos tratados comparados com o grupo controle, expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) e desvio padrão. *One Way ANOVA*.

**Figura 13.** Fotos representativas do ensaio clonogênico após sete dias de tratamento.

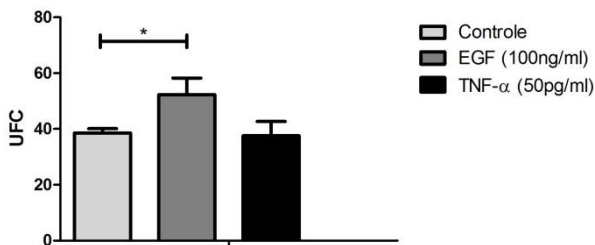


Células fixadas com formalina a 10 % e coradas com GIEMSA.

### 6.1.1.3. SK-mel-147

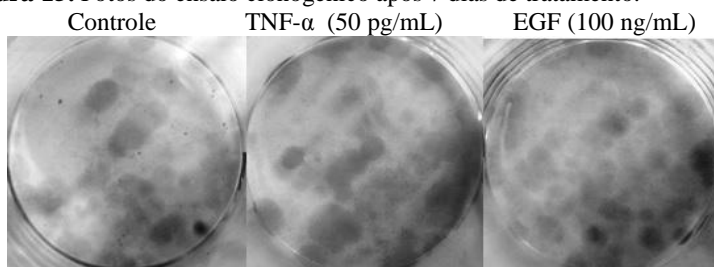
Com esta linhagem de melanoma, o EGF foi capaz de aumentar a capacidade de clonogenicidade em relação ao controle sem tratamento.

**Figura 14.** Ensaio clonogênico SK-mel-147.



Resultados expressos em média e desvio padrão. Controle sem tratamento; Células estimuladas com EGF (100 ng/mL); Células estimuladas com TNF- $\alpha$  (50 pg/mL). O gráfico exibe os grupos tratados comparados com o grupo controle, expresso em unidades formadoras de colônias (UFC) e desvio padrão. *One Way ANOVA*.

**Figura 15.** Fotos do ensaio clonogênico após 7 dias de tratamento.

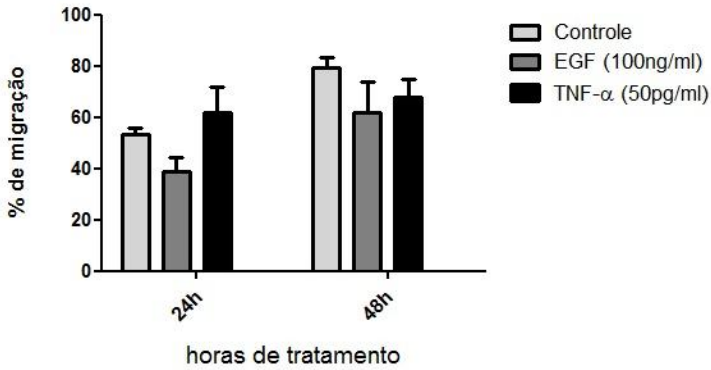


## 6.1.2. Ensaio de migração 2D

### 6.1.2.1. SK-mel-19

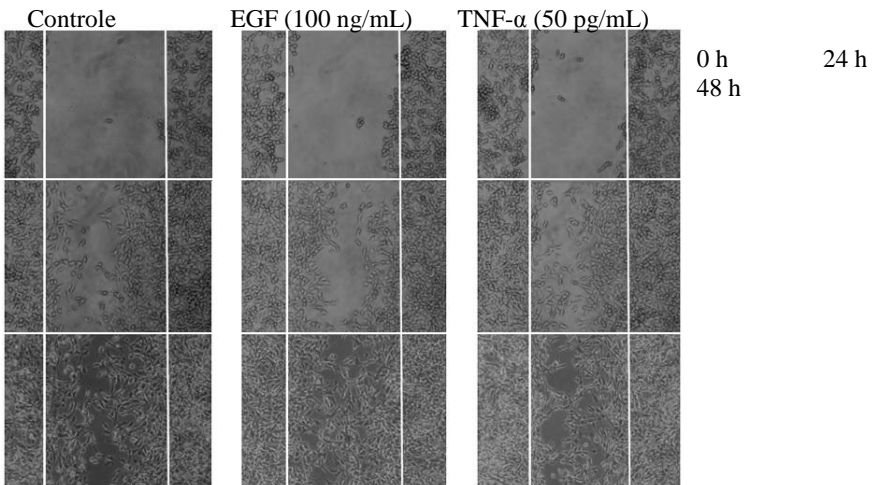
O ensaio de migração com a SK-mel-19 não demonstrou um aumento na capacidade migratória destas células ao serem estimuladas com citocinas inflamatórias, provavelmente devido ao fato de que esta linhagem celular não apresente a capacidade de metástase (ALLA et al., 2009).

**Figura 16.** Ensaio de migração 2D com SK-mel-19.



Resultados expressos em média e desvio padrão. Controle sem tratamento; células tratadas com EGF; células tratadas com TNF- $\alpha$ . O gráfico demonstra a comparação dos grupos tratados com o grupo controle, em porcentagem de migração após 24 e 48 horas de tratamento. *Two Way* ANOVA.

**Figura 17.** Fotos representativas do ensaio de migração 2D com SK-mel-19.

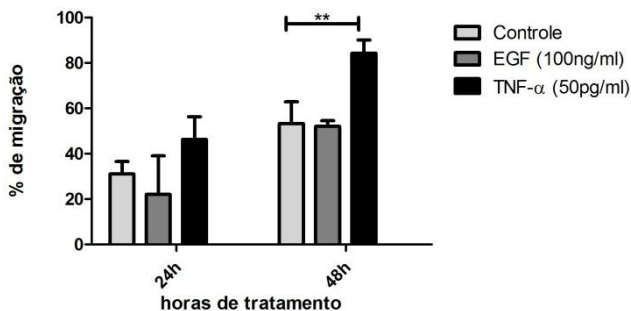


As fotos foram tiradas no momento do tratamento (tempo 0 h), 24 e 48 horas após. Compara-se a área de migração entre os grupos com auxílio do *software* ImageJ®. Aumento de 100x.

### 6.1.2.2. SK-mel-28

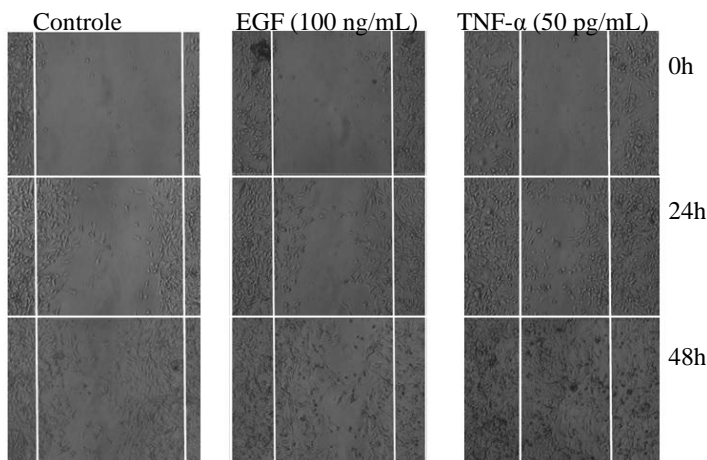
Neste experimento, que visou avaliar a capacidade de migração das células, observou-se uma diferença significativa ( $p \leq 0,01$ ) quando tratadas com TNF- $\alpha$  se comparadas ao controle.

**Figura 18.** Ensaio de migração 2D com SK-mel-28.



Resultados expressos em média e desvio padrão. Controle sem tratamento; células tratadas com EGF; células tratadas com TNF- $\alpha$ . O gráfico demonstra a comparação dos grupos tratados com o grupo controle, em porcentagem de migração após 24 e 48 horas de tratamento. (\*\*\*)  $p \leq 0,01$ . *Two Way ANOVA*.

**Figura 19.** Fotos representativas do ensaio de migração 2D com SK-mel-28.



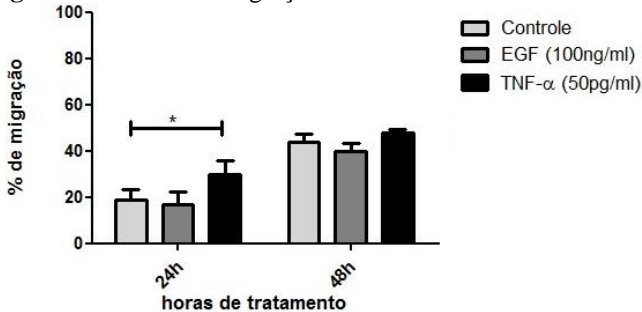
As fotos foram tiradas no dia do tratamento (tempo 0 h), e após 24 e 48 horas. A área de migração é comparada entre os grupos com auxílio do *software* ImageJ®. Aumento de 100x.

A citocinas utilizadas neste experimento não provocaram alterações significativas nas fases do ciclo celular desta linhagem de melanoma.

### 6.1.2.3. SK-mel-147

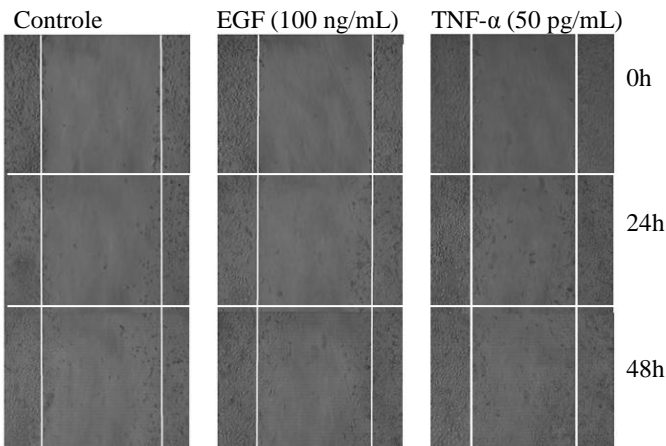
No ensaio de migração com esta linhagem de melanoma foi possível observar uma diferença significativa com TNF- $\alpha$  após 24 horas de tratamento ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 20.** Ensaio de migração 2D com SK-mel-147



Resultados expressos em média e desvio padrão. Controle sem tratamento; células tratadas com EGF; células tratadas com TNF- $\alpha$ . O gráfico demonstra a comparação dos grupos tratados com o grupo controle, em porcentagem de migração após 24 e 48 horas de tratamento. *Two Way* ANOVA.

**Figura 21.** Fotos representativas do ensaio de migração 2D com SK-mel-147. Aumento de 100x.

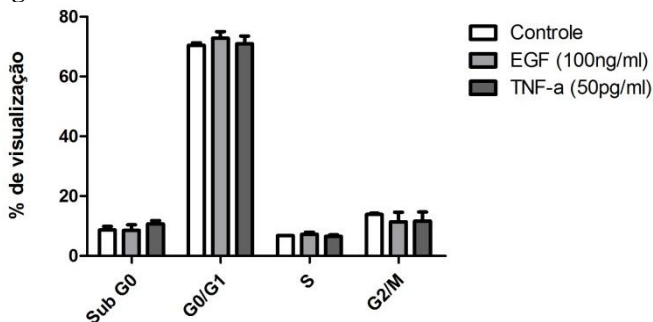


### 6.1.3. Análise do Ciclo Celular

#### 6.1.3.1. SK-mel-19

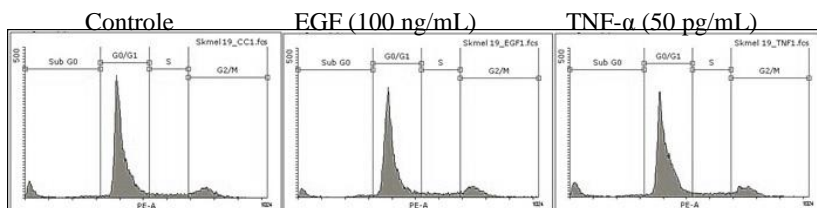
A citocinas utilizadas neste experimento não provocaram alterações significativas nas fases do ciclo celular desta linhagem de melanoma.

**Figura 22.** Análise do ciclo celular SK-mel-19.



Resultados expressos em média e desvio padrão. Grupo controle sem tratamento; células tratadas com EGF; células tratadas com TNF- $\alpha$ . Os grupos foram comparados com o controle em cada fase do ciclo. A análise de variância utilizada foi *Two Way* ANOVA. O gráfico apresenta os grupos em porcentagem de visualização das células marcadas com iodeto de propídio em cada fase do ciclo.

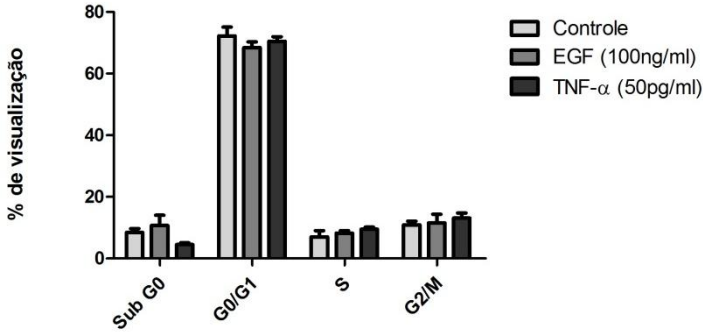
**Figura 23.** Histogramas representativos da análise do ciclo celular de SK-mel-19, obtidos com auxílio do *software* Flowing®.



#### 6.1.3.2. SK-mel-28

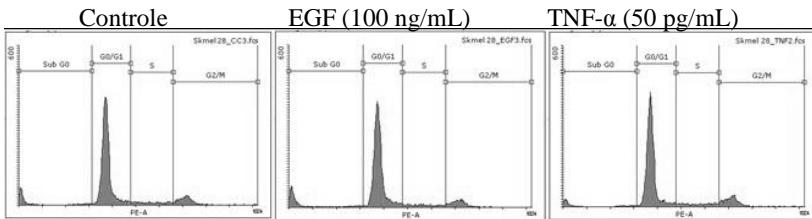
Como observado com a linhagem SK-mel-19, o ciclo celular com a SK-mel-28 não demonstrou diferenças significativas em nenhuma fase quando tratadas com citocinas e comparadas com o controle sem tratamento.

**Figura 24.** Análise do ciclo celular SK-mel-28.



Resultados expressos em média e desvio padrão. Grupo controle sem tratamento; células tratado com EGF; células tratadas com TNF- $\alpha$ . Os grupos foram comparados com o controle em cada fase do ciclo. O gráfico mostra os grupos em porcentagem de visualização das células marcadas com iodeto de propídio em cada fase do ciclo, e desvio padrão. *Two Way* ANOVA.

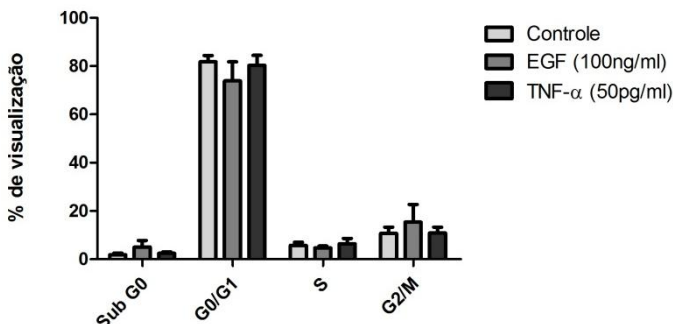
**Figura 25.** Histogramas representativos da análise do ciclo celular de SK-mel-28, obtidos com auxílio do *software* Flowing@.



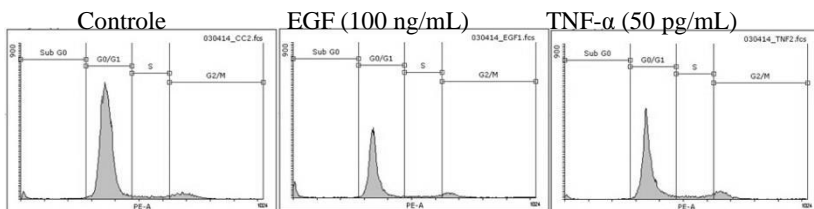
### 6.1.3.3. SK-mel-147

Igualmente às outras duas linhagens de melanoma, o ciclo celular nesta linhagem não demonstrou alterações entre as fases quando comparadas com o controle sem tratamento.



**Figura 26.** Análise do ciclo celular SK-mel-147.

Resultados expressos em média e desvio padrão. Grupo controle sem tratamento; células tratado com EGF; células tratadas com TNF- $\alpha$ . Os grupos foram comparados com o controle em cada fase do ciclo. O gráfico exibe os grupos em porcentagem de visualização e desvio padrão. A análise de variância utilizada foi *Two Way ANOVA*.

**Figura 27.** Histogramas representativos da análise do ciclo celular de SK-mel-147, obtidos com auxílio do *software* Flowing®.

#### 6.1.4. Resumo dos resultados preliminares

Os primeiros experimentos foram realizados com as três linhagens de melanoma (SK-mel-19; SK-mel-28 e SK-mel-147) tratadas com TNF- $\alpha$  e EGF a fim de avaliar alterações na capacidade migratória, clonogênica e nas fases do ciclo celular de cada linhagem.

Os resultados obtidos após estes experimentos estão expressos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultados dos experimentos iniciais.

	SK-mel-29 TNF- $\alpha$ /EGF	SK-mel-28 TNF- $\alpha$ /EGF	SK-mel-147 TNF- $\alpha$ /EGF
<b>Clonogênico</b>	- / -	** / *	- / *
<b>Migração 2D</b>	- / -	** / -	* / -
<b>Ciclo celular</b>	- / -	- / -	- / -

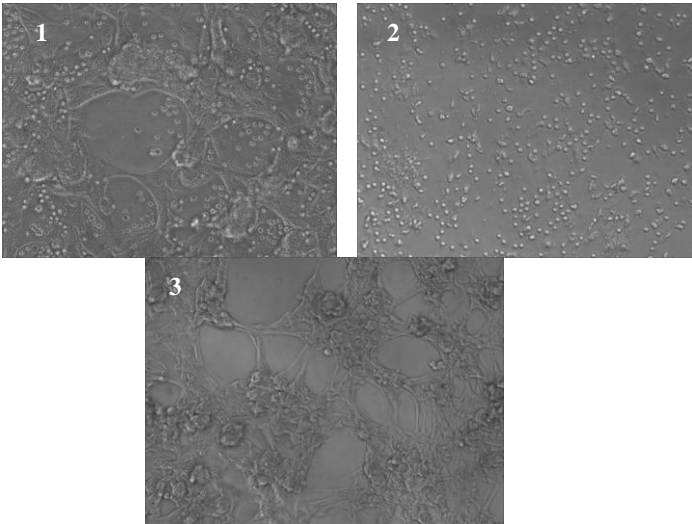
(-) sem diferença significativa; (\*)  $p \leq 0,05$ ; (\*\*)  $p \leq 0,01$ .

## 6.2. CO-CULTURA DE MELANOMA E MONONUCLEARES

### 6.2.1. Determinação de citocinas no sobrenadante da co-cultura de melanoma e mononucleares tratados com estímulos inflamatórios (TNF- $\alpha$ e EGF)

A co-cultura, sistema de cultivo utilizando a linhagem de melanoma SK-mel-28 e mononucleares isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis (PBMC) foi realizada com os tratamentos de TNF- $\alpha$  (25 pg/mL) e EGF (100 ng/mL). As citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 e TNF- $\alpha$  foram quantificadas no sobrenadante da co-cultura após 48 horas de tratamento. Os resultados foram representados nas figuras a seguir, separados em grupos: Co-cultura de melanoma com PBMC; monocamada de melanoma e monocamada de PBMC.

**Figura 28.** Fotos da co-cultura de melanoma e PBMC.



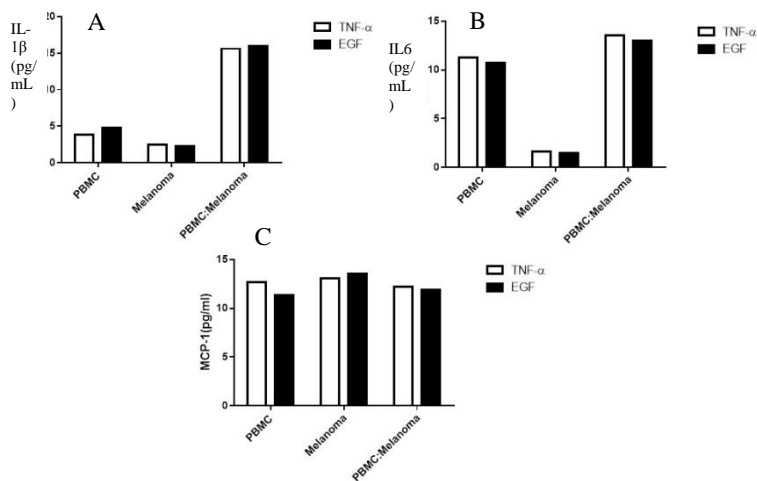
(1) Co-cultura 1:2, melanoma:PBMC, aumento de 200x; (2) PBMC em monocamada, aumento de 200x; (3) melanoma em monocamada, aumento de 200x.

**Fonte:** do autor.

### 6.2.2. Determinação das citocinas na co-cultura tratada com citocinas recombinantes

Foi realizada reação imunoenzimática para quantificar citocinas no sobrenadante da co-cultura de melanoma com mononucleares após 48 horas do estímulo com TNF- $\alpha$  (25 pg/mL) e EGF (100 ng/mL). Observou-se que quando em co-cultura, as células tornaram-se capazes de liberar IL-1 $\beta$  no sobrenadante. Em relação à IL-6, os mononucleares em monocamada são os responsáveis pela liberação desta citocina, mas em co-cultura, tornaram-se mais capazes de liberar este mediador inflamatório. Já o MCP-1 mostrou-se presente no sobrenadante tanto das células em monocamada quanto em co-cultura, demonstrando a capacidade de ambas as linhagens de liberarem esta citocina.

**Figura 29.** Concentração de citocinas após tratamento com TNF- $\alpha$  e EGF.



Quantificação de IL-1 $\beta$  (A); IL-6 (B) e MCP-1 (C) no sobrenadante da co-cultura de SK-mel-28 e PBMC, monocamada de SK-mel-28 e monocamada de PBMC, tratados com TNF- $\alpha$  e EGF. Resultados expressos em pg/mL.

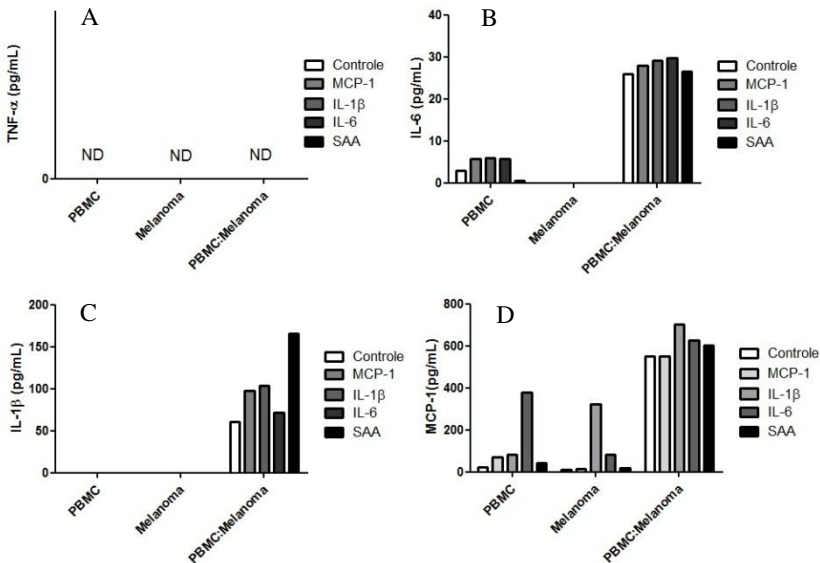
Realizou-se o mesmo experimento após 48 horas do tratamento com TNF- $\alpha$  (25 pg/mL), EGF (100 ng/mL), MCP-1 (25 pg/mL), IL-1 $\beta$  (10 pg/mL), IL-6 (10 pg/mL) e SAA (75 ng/mL), a fim de quantificar IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 no sobrenadante.

Observou-se um aumento na concentração de MCP-1 na co-cultura de melanoma com PBMC quando comparado com os outros

grupos, mas também em monocamada de PBMC quando tratadas com TNF- $\alpha$  e IL-6, e monocamada de melanoma tratada com IL-1 $\beta$ .

A IL-1 $\beta$  foi detectável apenas na co-cultura, com uma maior liberação, de duas vezes mais, quando tratadas com SAA. Já a IL-6 mostrou-se presente no sobrenadante de mononucleares em monocamada, com um aumento de aproximadamente duas vezes na liberação desta citocinas pelas células tratadas com TNF- $\alpha$  quando comparadas com os outros grupos. É possível observar que quando em co-cultura, a IL-6 foi secretada em maior concentração, possivelmente apenas por mononucleares.

**Figura 30.** Quantificação de citocinas no sobrenadante da co-cultura.



TNF- $\alpha$  (A); IL-6 (B); IL-1 $\beta$  (C) e MCP-1 (D) no sobrenadante da co-cultura de SK-mel-28 com PBMC, SK-mel-28 em monocamada e PBMC em monocamada após tratamento com citocinas recombinantes. Resultados expressos em pg/mL.

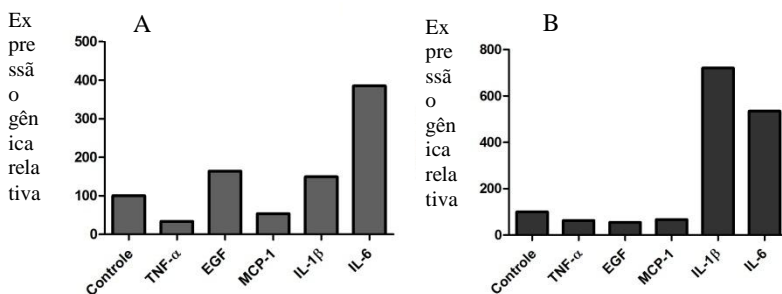
### 6.2.3. Expressão gênica de B-RAF e N-RAS de células de melanoma tratadas com citocinas

Após 48 horas de tratamento com citocinas recombinantes, realizou-se a extração de RNA total e síntese de DNA complementar a fim de executar PCR em tempo real para analisar alterações na expressão gênica de B-RAF e N-RAS.

Notou-se um aumento de aproximadamente duas vezes na expressão de B-RAF com as células de melanoma tratadas com EGF, quando comparadas com o controle. Já a IL-6 demonstrou aumentar em quatro vezes a expressão do gene que codifica B-RAF.

Em relação à N-RAS, a IL-6 foi capaz de aumentar em aproximadamente cinco vezes, enquanto que a IL-1 $\beta$  ampliou a expressão em sete vezes em relação ao controle.

**Figura 31.** Expressão gênica de B-RAF e N-RAS.



B-RAF (A) e N-RAS (B) da linhagem de melanoma SK-mel-28 estimulada com as citocinas TNF- $\alpha$  (25 pg/mL); EGF (100 ng/mL); MCP-1 (25 pg/mL); IL-1 $\beta$  (10 pg/mL); IL-6 (10 pg/mL). Os gráficos estão demonstrados em  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Expressão gênica relativa à amostra controle.

### 6.3. RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA

#### 6.3.1. Soro dos indivíduos obesos e magros

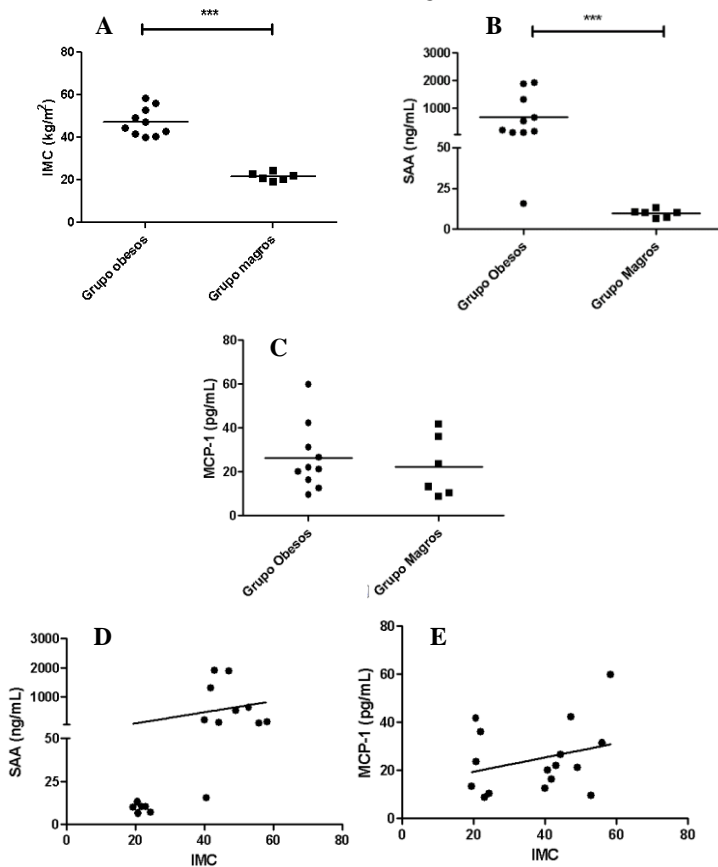
Para a utilização do soro derivado de pacientes obesos e indivíduos magros, estes foram caracterizados quanto a idade, gênero e IMC Tabela 4 ilustra estes parâmetros.

**Tabela 4.** Caracterização dos grupos de indivíduos obesos e magros

N	Indivíduos obesos		Indivíduos magros	
	10		6	
Idade	47,6 (31 - 62)		29,5 (23 - 40)	
Gênero (%)	80 (F)	20 (M)	80 (F)	20 (M)
Peso (kg)	131,3 (105 - 175)		63,1 (58 - 72)	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	47,3 (40 - 55,9)		21,7 (19,3 - 24,3)	

A Figura 32 representa a caracterização do soro dos dois grupos de indivíduos quanto ao IMC, concentração de SAA e MCP-1, e correlação entre a concentração de SAA e IMC; e MCP-1 e IMC. Foi possível observar a diferença da mediana do IMC entre os obesos e magros avaliados, com  $p \leq 0,001$ . Ainda, a mediana da concentração de SAA entre os grupos também apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,001$ ). Além disso, a correlação entre SAA e IMC apresentou uma tendência de aumento de IMC conforme o aumento da concentração de SAA. O mesmo ocorreu na correlação entre MCP-1 e IMC.

**Figura 32.** Resultado do IMC dos obesos e magros, SAA e MCP-1.



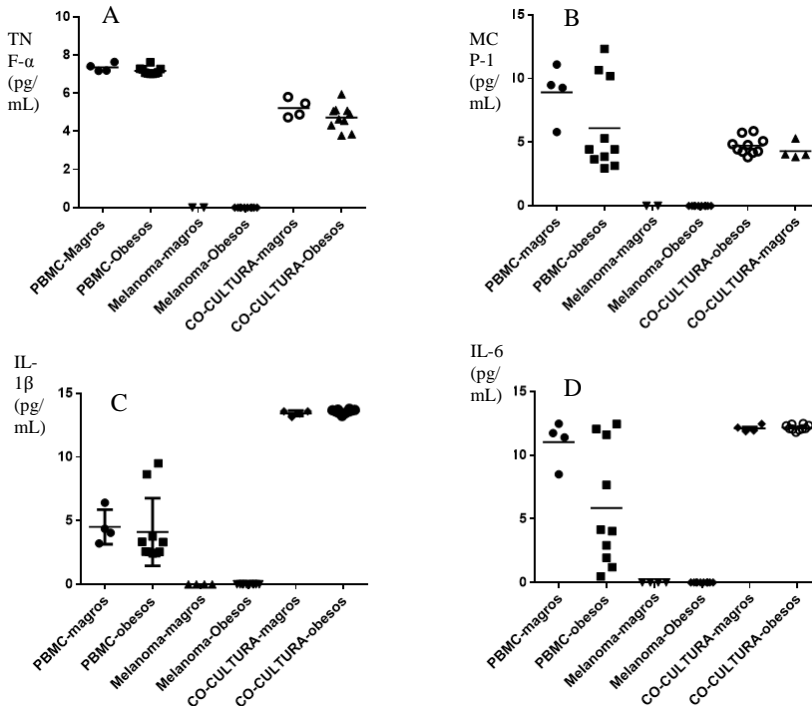
Índice de massa corporal dos indivíduos dos grupos obesos e magros (A); caracterização do soro dos indivíduos obesos e magros em relação à

concentração de SAA (B); caracterização do soro dos grupos obesos e magros quanto à concentração de MCP-1 (C). Valores expressos em mediana e o teste U de Mann-Whitney foi realizado. (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ; correlação entre a concentração de SAA e IMC entre os dois grupos (D); correlação entre o IMC e a concentração de MCP-1 nos dois grupos (E). Regressão linear entre os dados individuais.

### **6.3.2. Determinação de citocinas no sobrenadante da co-cultura estimulada com soro dos indivíduos**

Foi realizada a co-cultura de células de melanoma com mononucleares a fim de quantificar citocinas no sobrenadante após 48 horas de estímulo com soro dos indivíduos dos dois grupos.

Observou-se a capacidade dos mononucleares em secretar TNF- $\alpha$  quando estimulados tanto com soro de indivíduos obesos quanto dos magros. A IL-1 $\beta$  e IL-6 apresentaram-se em concentrações maiores no sobrenadante da co-cultura quando comparadas com o sobrenadante da monocamada de mononucleares e monocamada de melanoma. Entretanto, não houve diferença significativa entre as medianas das células de melanoma, PBMC e melanoma:PBMC estimuladas com soro de pacientes obesos e indivíduos magros.

**Figura 33.** Determinação de citocinas no sobrenadante.

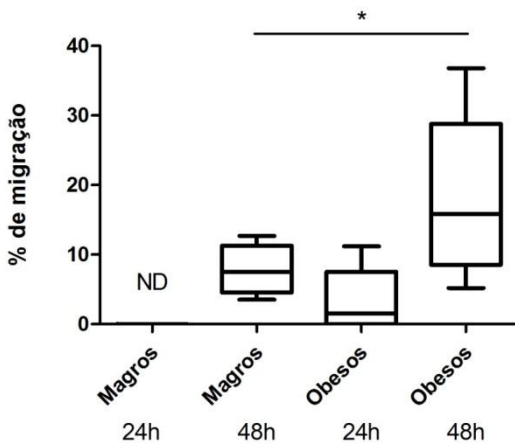
Determinação de TNF- $\alpha$  (A); MCP-1 (B); IL-1 $\beta$  (C) e IL-6 (D) na co-cultura de melanoma com mononucleares, monocamada de melanoma e mononucleares em monocamada, estimulados com soro dos indivíduos dos grupos obeso e magro.

### 6.3.3. Migração 2D de células de melanoma estimuladas com soro de obesos e magros

O ensaio de migração foi também realizado com estímulo de soro dos indivíduos obesos e magros, na SK-mel-28. Foi possível observar uma diferença significativa na capacidade migratória das células de melanoma quando tratadas com soro dos obesos, após 48 horas de tratamento, ao serem comparadas com a migração após 48 horas com o soro dos indivíduos magros ( $p \leq 0,05$ ).

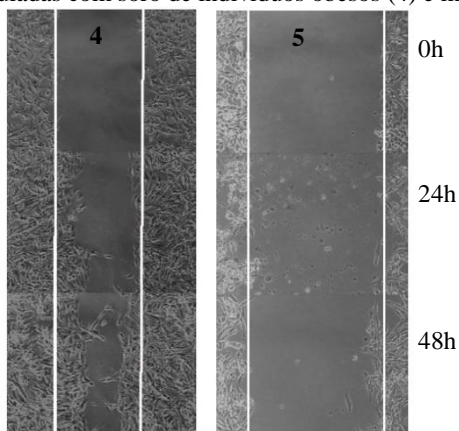


**Figura 34.** Ensaio de migração de SK-mel-28 estimulada com soro dos indivíduos magros e obesos.



Resultado expresso em porcentagem de migração dos grupos nos diferentes tempos de tratamento, 24 e 48 horas.

**Figura 35.** Fotos representativas do ensaio de migração com células de melanoma estimuladas com soro de indivíduos obesos (4) e magros (5).

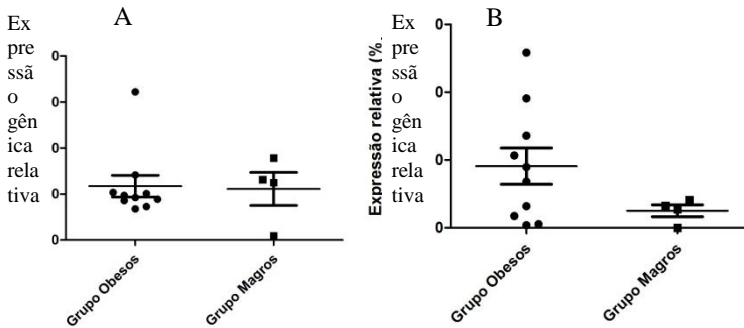


Aumento de 100x.

### 6.3.4. Expressão gênica de B-RAF e N-RAS de células de melanoma estimuladas com soro dos indivíduos

A monocamada de células de melanoma foi exposta aos soros dos pacientes obesos e indivíduos magros a uma concentração de 10 % em meio de cultura DMEM. É possível observar que a mediana da expressão gênica relativa de B-RAF não se alterou entre os grupos obesos e magros. Já a mediana da expressão de N-RAS apresentou um aumento após o tratamento com soro dos obesos em relação ao grupo dos magros.

**Figura 36.** Expressão gênica relativa de B-RAF e N-RAS após estímulo com soro do grupo dos obesos e dos magros.



Expressão gênica de N-RAS (A) e B-RAF (B) da linhagem de melanoma SK-mel-28 estimulada com soro dos indivíduos obesos e magros. Os gráficos estão demonstrados em  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  multiplicado por 100.

## 7. DISCUSSÃO

Este trabalho visou estabelecer conexões entre fatores inflamatórios derivados da obesidade e a progressão de células malignas no microambiente tumoral. Foram realizados diversos experimentos a fim de avaliar a capacidade de clonogenicidade, analisar a habilidade de migração, alterações no ciclo celular, modificações na expressão de genes de interesse, quantificação de citocinas no sobrenadante de co-cultura com mononucleares e tratamento com soro de indivíduos obesos e magros nas células de melanoma.

Diante dos resultados, a atuação de certas citocinas pró-inflamatórias, derivadas ou não de quadros de obesidade, parecem contribuir para a progressão e aumento da agressividade de células de melanoma *in vitro*. Isolados celulares de linhagens distintas de melanoma demonstraram alterações significativas em termos de sobrevivência celular na presença de estímulos inflamatórios como EGF e TNF- $\alpha$ . Além disso, em situações nas quais as células de melanoma foram cultivadas com mononucleares isolados do sangue periférico, o papel de certas citocinas foi evidente na modulação deste conjugado celular levando à produção e liberação de citocinas no sobrenadante da co-cultura. Finalmente, o soro de pacientes obesos parece conter fatores inflamatórios importantes, promoveu aumento da migração em uma linhagem celular de melanoma altamente agressivo, resultado, possivelmente, de alteração da expressão gênica de proteínas da cascata das MAPK, a B-RAF e a N-RAS.

Para que as conexões citadas pudessem ser estabelecidas, foram realizados, primeiramente, os ensaios de clonogenicidade, migração 2D e análise do ciclo celular com as três linhagens de melanoma (SK-mel-19; SK-mel-28 e SK-mel-147) tratadas com TNF- $\alpha$  e EGF, demonstrando que o efeito destas citocinas promoveu um aumento na proliferação e migração principalmente da SK-mel-28, linhagem de melanoma que apresenta B-RAF superexpresso.

A SK-mel-28 é uma linhagem celular de melanoma altamente agressivo, com alto potencial metastático e invasivo além de ser pouco responsivo a tratamentos antitumorais (DAVERI et al., 2015). Esta linhagem, e a linhagem SK-mel-19, apresentam mutação em B-RAF (DAVIES et al., 2002; GORDEN et al., 2003; LEE; CHOI; KIM, 2011). Tal mutação está presente em aproximadamente 7 % de todos os tipos de câncer (GARNETT; MARAIS 2004; DAVIES et al., 2002), mas apresenta-se em mais de 60 % dos casos de melanoma (RIBAS; FLAHERTY, 2011). Já a SK-mel-147, outra linhagem de melanoma abordada neste trabalho, apresenta mutação em N-RAS (LEE; CHOI;

KIM, 2011; GORDEN et al., 2003). Estudos com estas linhagens já estão sendo realizados. A SK-mel-19 vem sendo estudada a fim de elucidar o mecanismo de ação de antitumorais como vemurafenib (BECK et al., 2013); a SK-mel-28 foi abordada em um estudo de 2007 com objetivo de utilizar inibidores da via das MAPK para avaliar um possível novo tratamento contra o melanoma (MEIER et al., 2007), além de auxiliar no estudo da capacidade antiproliferativa de roterlina (DAVERI et al., 2015); estudos para avaliar o potencial antiproliferativo de metiltioadenosina em células de melanoma utilizaram SK-mel-147 e SK-mel-28 (ANDREU-PEREZ et al., 2010).

Os efeitos do TNF- $\alpha$  em linhagens de melanoma já vêm sendo estudados há alguns anos. Katerinaki e colaboradores (2003) comprovaram que esta citocina foi capaz de aumentar em 21% a capacidade de migração de células de melanoma HBL (B-RAF *wild type*) estimuladas com 200 pg/mL de TNF- $\alpha$  após 24 horas de tratamento ( $p \leq 0,05$ ). Outro estudo realizado por Zhu *et al.* (2004) constatou que células de melanoma, também da linhagem HBL, tratadas com 300 pg/mL de TNF- $\alpha$  aumentaram sua capacidade migratória em relação ao controle sem tratamento ( $p \leq 0,001$ ). Também, Eves *et al.* (2003) relatou um aumento de aproximadamente 180% na invasão de células de melanoma uveal (intraocular) quando tratadas com 100 pg/mL de TNF- $\alpha$ . Neste trabalho, utilizou-se a concentração de 50 pg/mL nas diferentes linhagens, observando-se resultados expressivos na migração e clonogenicidade em células de melanoma que apresentam mutação em B-RAF.

Já os estudos dos efeitos do EGF em células de melanoma são escassos, porém Bracher et al. (2013) constatou que o silenciamento do gene do EGF em células de melanoma em que este gene estava superexpresso, resultou em uma diminuição na capacidade migratória e proliferativa destas células. Além disso, foi possível demonstrar a relação entre EGF e VEGF no aumento da metástase e angiogênese de células de melanoma. No presente trabalho, as possíveis ações do EGF na migração, clonogenicidade e no ciclo celular foram exploradas, verificando-se que as linhagens celulares SK-mel-28 e SK-mel-147 (B-RAF mutada e N-RAS mutada, respectivamente) sofreram um aumento significativo na clonogenicidade, fato não verificado na SK-mel-19.

Diante das alterações observadas na clonogenicidade e migração celular principalmente em linhagem com mutação em B-RAF, SK-mel-28, realizou-se a co-cultura de melanoma com PBMC. Nesta fase, os resultados sugeriram que a presença dos estímulos de TNF- $\alpha$  e EGF foi suficiente para a liberação de citocinas como IL-6, MCP-1 e IL-1 $\beta$  no

sobrenadante. A secreção de IL-1 $\beta$  no sobrenadante da co-cultura pode estar relacionada à presença destes mediadores inflamatórios, TNF- $\alpha$  e EGF, em contato com a célula de melanoma. A IL-1 $\beta$  vem sendo considerada de extrema importância na contribuição do desenvolvimento e progressão tumoral (QIN et al., 2011). Estudos comprovam que a IL-1 está superexpressa em muitos tipos de câncer (ELARAJ et al., 2006), e a mutação em B-RAF (V600E), como é o caso da SK-mel-28, induz a transcrição de IL-1. Além disso, a utilização de receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) é capaz de suprimir a proliferação e potencializar a ação de antitumorais inibidores de B-RAF (KHALILI et al., 2012). Ou seja, a interrupção da sinalização de IL-1 em células de melanoma que superexpressam o gene para esta citocina impede o crescimento tumoral (QIN et al., 2011). Sendo assim, a presença de mediadores inflamatórios no sistema de co-cultura de melanoma:PBMC promove a liberação exacerbada de IL-1 $\beta$ , que pode contribuir para o crescimento tumoral.

A co-cultura é uma ferramenta fundamental na pesquisa de interações entre diferentes populações celulares e interações entre as células (GOERS; FREEMONT; POLIZZI, 2014). É possível realizá-la de forma indireta, com a utilização de *inserts* que não permitem o contato entre os tipos celulares; e a direta, a qual possibilita a interação celular, mimetizando o microambiente tumoral. Neste trabalho, a ação das citocinas recombinantes induzindo a secreção de proteínas inflamatórias auxilia na elucidação do papel destes mediadores no local do tumor.

A liberação de IL-6 e MCP-1 em condições de co-cultura direta, verificada neste trabalho, pode estar relacionada ao infiltrado macrofágico presente em diversos tipos de tumores sólidos. Este fato foi observado com estímulo de diversas citocinas na co-cultura. Estas citocinas secretadas poderiam facilitar a ação das células do sistema imune na proteção das células malignas. Neste trabalho não foi possível determinar a polarização dos macrófagos quanto a M1 ou M2, mas certamente a ação destas citocinas liberadas podem promover a quimiotaxia no microambiente tumoral. A IL-6 atua também no aumento da proliferação e sobrevivência celular através da ativação de STAT3, ativando NF- $\kappa$ B (GRIVENNIKOV et al., 2009; LIU et al., 2014). Além disso, um estudo de 2010 comprovou que a ação de TNF- $\alpha$ , na concentração de 10ng/mL, aumentou a expressão de RNA mensageiro de MCP-1 e IL-6 em fibroblastos associados ao tumor, facilitando a metástase e progressão das células malignas (MUELLER et al., 2010). A IL-6 atua de forma parácrina a fim de promover

angiogênese e progressão tumoral em células com mutação em RAS, e a inibição desta citocina pode apresentar utilidade terapêutica no tratamento de tumores que apresentam mutação no oncogene RAS (ANCRILE; LIM; COUNTER, 2007).

Ainda no sistema de co-cultura estabelecido neste trabalho, as diversas citocinas utilizadas como estímulos inflamatórios (SAA, IL-1 $\beta$ , IL-6 e MCP-1) promoveram alterações significativas na produção e secreção de IL-6, IL-1 $\beta$  e MCP-1 no sobrenadante das co-culturas. Destaca-se a indução da IL-1 $\beta$  na liberação de MCP-1 no sobrenadante da co-cultura, um importante fator quimiotático. Já foi descrita a ação desta citocina na liberação do quimioatraente MCP-1 por Perry e colaboradores (1998) em células endoteliais humanas. Além disso, a proteína inflamatória SAA promoveu a liberação relevante de MCP-1, IL-6 e principalmente de IL-1 $\beta$ . Estas induções promovidas pela SAA já foram descritas anteriormente em outros modelos celulares. Faty e colaboradores (2012) demonstraram que a SAA estimulou a secreção de MCP-1, IL-6 e IL-8 em adipócitos humanos. Ainda, a SAA promoveu a liberação de IL-6 e TNF- $\alpha$  em pré-adipócitos e adipócitos murinos maduros, reportado por Filippin-Monteiro e colaboradores (2012). Finalmente, a secreção mais intensa de IL-1 $\beta$  provocada por SAA observada em nosso estudo, já foi reportada em um estudo anterior no qual os autores observaram este fenômeno em queratinócitos (YU et al., 2015). Vale ressaltar que a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante das culturas foi expressivamente observada neste trabalho somente em condições de co-cultura, reforçando a importância do modelo de microambiente tumoral e *crosstalk* entre as unidades celulares.

Visto que as citocinas pró-inflamatórias promovem alterações importantes em células de melanoma, e que certas citocinas podem ser derivadas do tecido adiposo de indivíduos obesos, foram realizados experimentos a fim de estabelecer um elo entre estas duas situações: obesidade e progressão tumoral. Para isto, foram recrutados dez indivíduos obesos com uma média de IMC de 47,3 kg/m<sup>2</sup>. Estes indivíduos possuíam citocinas pró-inflamatórias no soro, as quais podem alterar isolados celulares de melanoma, bem como no sistema de co-cultura. Classicamente, as citocinas pró-inflamatórias mais relevantes no soro de indivíduos obesos (muitas delas diretamente proporcionais ao IMC), são a SAA (GOMEZ-AMBROSI et al., 2006; LAPPALAINEN et al., 2008) e MCP-1 (KIM et al., 2006). Neste trabalho, observou-se essa relação entre obesidade e os marcadores inflamatórios MCP-1 e SAA, evidenciado pelas diferenças entre os grupos obesos e magros.

A partir da caracterização do soro destes indivíduos, as células de melanoma foram expostas a estes estímulos para a realização da co-cultura direta de células de melanoma (SK-mel-28) e PBMC. Alguns estudos já realizaram experimentos *in vitro* utilizando soro de obesos para avaliar a ação em células de câncer. Por exemplo, Price e colaboradores (2012) comprovaram que o soro de camundongos obesos contendo altas concentrações de IL-6, VEGF e leptina foi capaz de aumentar a proliferação, invasão, migração e atividade de MMP em células de câncer de próstata. Fato também relatado por Lamarre e colaboradores (2007), que comprovaram que o soro de ratos obesos aumentou a resposta mitogênica de células de câncer de próstata *in vitro*.

No presente trabalho, obtivemos um aumento na secreção principalmente de IL-1 $\beta$  e IL-6 na co-cultura tratada com soro dos indivíduos obesos e magros. A indução na produção e liberação destas citocinas no sobrenadante das co-culturas tratadas com soro de ambos os grupos não foi diferente. Este fato pode ser explicado pelas diversas citocinas pró e anti-inflamatórias presentes no soro dos dois grupos de indivíduos. Estudos citados anteriormente relatam somente alterações mitóticas de tumores *in vitro* na presença de soro com perfil inflamatório. Este trabalho evidenciou tal situação. Apesar de não haver diferença entre o perfil de liberação de citocinas induzidas pelos soros de magros e obesos, houve sim diferença no padrão migratório de células de melanoma na presença destes soros. Observou-se um aumento significativo na migração com o soro de pacientes obesos. Este fato levou a hipótese de possíveis alterações na expressão de genes relacionados à sobrevivência e proliferação celular.

Diante do padrão mitótico exacerbado promovido pelo soro de pacientes obesos, as células de melanoma SK-mel-28 em monocamada foram expostas aos mesmos soros dos grupos obesos e magros para a verificação da expressão dos genes de interesse. A expressão de B-RAF e N-RAS demonstrou um aumento com tratamento de soro de alguns dos indivíduos obesos. Este fato pode estar associado à indução na expressão destes oncogenes pela liberação de citocinas pró-inflamatórias. O aumento na capacidade migratória das células de melanoma, observado neste estudo, pode ser relacionado ao aumento na expressão dos genes de B-RAF e N-RAS induzida pela ação de citocinas. Vu e colaboradores (2015) observaram um aumento na migração de células de melanoma com mutação em N-RAS em resposta a estímulo de EGF.





## 8. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi possível avaliar o aumento na capacidade de clonogenicidade da SK-mel-28 e SK-mel-147 após o tratamento com citocinas inflamatórias. Também observamos maior porcentagem de migração nestas duas linhagens de melanoma com os mesmos estímulos inflamatórios. Não foi possível observar tais alterações na linhagem SK-mel-19 e no ciclo celular das três linhagens de melanoma.

Observamos, também, a liberação de certas citocinas no sobrenadante da co-cultura de melanoma com PBMC quando estimuladas com citocinas pró-inflamatórias.

Relatamos um aumento na expressão de B-RAF e N-RAS nas células da linhagem SK-mel-28 após estímulos com proteínas inflamatórias. Além disso, o tratamento com soro de indivíduos obesos também resultou no aumento da expressão destes oncogenes.

Portanto, este estudo relatou um aumento na capacidade migratória de células de melanoma quando estimuladas com citocinas pró-inflamatórias, além de comprovar a ação destes mediadores na expressão de oncogenes relacionados à uma maior agressividade tumoral. Também constatou que mononucleares na presença de células de melanoma são capazes de liberar citocinas que facilitam a metástase e proliferação de células malignas.

Algumas destas citocinas presentes no soro de indivíduos obesos podem ser responsáveis pelo aumento na expressão de B-RAF e N-RAS na linhagem de melanoma SK-mel-28.

Isto indica que as proteínas inflamatórias podem servir como alvo secundário na terapia antitumoral, auxiliando no tratamento do melanoma, além de poderem auxiliar no emagrecimento de indivíduos obesos. Para tanto, mais estudos devem ser realizados para comprovar esta relação.

As perspectivas deste trabalho estão relacionadas à avaliação da diferença da monoterapia de melanoma com fármacos atualmente utilizados, como vemurafenibe (inibidor de B-RAF) juntamente com antiinflamatórios, *in vitro* com SK-mel-28; analisar a diferença de tratamentos antitumorais em células de melanoma *in vitro* na presença de macrófagos polarizados a M1 e M2; e avaliar os efeitos de um pool de citocinas em linhagem celular de melanoma *in vitro* quanto à migração, proliferação e expressão gênica relativa de B-RAF e N-RAS.



## REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer: Short-Term Friend, Long-Term Foe. *Clinical Cancer Research* 15(2): 425–30. 2009.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 11:327–32. 2000.
- ALLA, V. et al. E2F1 in melanoma progression and metastasis. *J of Natl Cancer Inst.* 2009.
- ANCRILE, B.; LIM, K. M.; COUNTER, C. M. Oncogenic Ras-Induced Secretion of IL6 Is Required for Tumorigenesis. *Genes and Development* 21(14): 1714–19. 2007.
- ANDERSON, G. M.; NAKADA, M. T.; DEWITTE, M. Tumor Necrosis Factor-Alpha in the Pathogenesis and Treatment of Cancer. *Current opinion in pharmacology* 4(4): 314–20. 2004.
- ANDREU-PEREZ, P. et al. Methylthioadenosine (MTA) inhibits melanoma cell proliferation and *in vivo* tumor growth. *BMC Cancer.* 10, 265. 2010.
- APTE, R. N. et al. Effects of Micro-Environment- and Malignant Cell-Derived Interleukin-1 in Carcinogenesis, Tumour Invasiveness and Tumour-Host Interactions. *European Journal of Cancer* 42(6): 751–59. 2006.
- AZOURY, S. C.; LANGE, J. R. Epidemiology, Risk Factors, Prevention, and Early Detection of Melanoma. *The Surgical clinics of North America* 94(5): 945–62, vii. 2014.
- BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. Cancer: An Inflammatory Link. *Nature* 431(7007): 405–6. 2004.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and Cancer: Back to Virchow? *Lancet* 357(9255): 539–45. 2001.
- BALKWILL, F. TNF- $\alpha$  in Promotion and Progression of Cancer.

*Cancer and Metastasis Reviews* 25(3): 409–16. 2006.

BANDARCHI, B. et al. From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. *Dermatology Research and Practice*. 2010.

BECK et al. Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAF V600E melanoma cells. *Sci Signal*. 6(260). 2013.

BELL, S. et al. Involvement of NF- $\kappa$ B Signalling in Skin Physiology and Disease. *Cellular Signalling* 15(1): 1–7. 2003.

BERTAZZA, L.; MOCELLIN, S. The Dual Role of Tumor Necrosis Factor (TNF) in Cancer Biology. *Current medicinal chemistry* 17: 3337–52. 2010.

BRACHER, A. et al. Epidermal Growth Factor Facilitates Melanoma Lymph Node Metastasis by Influencing Tumor Lymphangiogenesis. *Journal of Investigative Dermatology* 133: 230–38. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Sobrepeso e obesidade, 2015. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2015/04/metade-dos-brasileiros-esta-com-excesso-de-peso>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

CAI, H. et al. Serum Amyloid A Induces Monocyte Tissue Factor. *The Journal of Immunology* 178(3): 1852–60. 2007.

CASTELLANO, E.; DOWNWARD, J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & Cancer* 2(3): 261–74. 2011.

CHUNG, J. H. Ultraviolet B irradiation-enhanced interleukin (IL)-6 production and mRNA expression are mediated by IL-1 alpha in cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106(4):715–720. 1996.

COLOTTA, F. et al. Cancer-Related Inflammation, the Seventh Hallmark of Cancer: Links to Genetic Instability. *Carcinogenesis* 30(7): 1073–81. 2009.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. *Nature*

420(6917): 860–67. 2002.

CROSBIE, E. J. et al. Body Mass Index, Hormone Replacement Therapy, and Endometrial Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 19(12): 3119–30. 2010.

CUMMINS, D. L. et al. Cutaneous Malignant Melanoma. *Mayo ClinProc*, v.81, n.4, p.500-507, 2006.

CURTIN, J. A. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 353: 2135-47. 2005.

DAVERI, E. et al. Antiproliferative Effect of Rottlerin on Sk-Mel-28 Melanoma Cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine* □ : *eCAM*2015: 545838. 2015.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* 417(6892): 949–54. 2002.

DEL PRETE, A. et al. Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Bioc Med*. v. 21. p 264-75. 2011.

DENNIS L. K. et al. Cutaneous melanoma and obesity in the agricultural health study. *Ann Epidemiol*;18:214–21. 2008.

DHILLON et al. MAP Kinase Signalling Pathways in Cancer. *Oncogene* 26(22): 3279–90. 2007.

ELARAJ, D. M. et al. The Role of Interleukin 1 in Growth and Metastasis of Human Cancer Xenografts. *Clinical Cancer Research* 12(4): 1088–96. 2006.

EVES, P. C et al. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Increases and  $\alpha$ -Melanocyte-Stimulating Hormone Reduces Uveal Melanoma Invasion Through Fibronectin. : 557–63. 2003.

FAN, Y. et al. NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell* 4(3):176–185. 2013.

FATY, A. et al. The Acute Phase Protein Serum Amyloid A Induces Lipolysis and Inflammation in Human Adipocytes through Distinct Pathways. *PLoS One*. 2012.

FECHER, L. A., SHARFMAN, W. H. Advanced basal cell carcinoma, the hedgehog pathway, and treatment options – role of smoothed inhibitors. *Biologics*, v. 6, p. 129-40. 2015.

FILIPPIN-MONTEIRO, F. B. et al. Serum amyloid A is a growth factor for 3T3-L1 adipocytes, inhibits differentiation and promotes insulin resistance. *Int. J. Obes.* 36(8):1032-9. 2012.

FONTANA, L. et al. Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes* 56(April): 1010–13. 2007.

FURLANETO, C. J.; CAMPA, A. Human, Interleukin-, Blood Neutrophil. “A Novel Function of Serum Amyloid A $\alpha$ : A Potent Stimulus for the Release of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  . *Interleukin*. 408: 405–8. 2000.

GALLAGHER, R. P. et al. Sunlight exposure, pigmentary factors and risk of nonmelanocytic skin cancer. I. Basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. V. 131, p. 157-63. 1995.

GANDINI, S.; AUTIER, P.; BONIOL, M.. Reviews on Sun Exposure and Artificial Light and Melanoma.” *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107(3): 362–66. 2011.

GARNETT, M. J.; MARAIS, R.. Guilty as Charged: B-RAF Is a Human Oncogene. *Cancer Cell* 6(4): 313–19. 2004.

GILBERT, C. A.; SLINGERLANG, J. M. Cytokines, obesity and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. *Annu Rev Med*. v. 64. p. 45-57. 2013.

GIRAUDO, E.; INOUE, M.; HANAHAN, D. An Amino-Bisphosphonate Targets MMP-9 - Expressing Macrophages and Angiogenesis to Impair Cervical Carcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 114(5): 623–33. 2004.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. Co-Culture Systems and

Technologies: Taking Synthetic Biology to the next Level. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 11(96): 20140065. 2014.

GOGAS, H. et al. Melanoma risk in association with serum leptin levels and lifestyle parameters: a case-control study. *Ann Oncol.* 19:384–9. 2008.

GOMEZ-AMBROSI, J. et al. Increased serum amyloid A concentrations in morbid obesity decrease after gastric bypass. *Obes Surg.* 16(3):262-9. 2006.

GORDEN, A. et al. Analysis of BRAF and N-RAS Mutations in Metastatic Melanoma Tissues. *Cancer research* 63(14): 3955–57. 2003.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma Biology and New Targeted Therapy. *Nature* 445(7130): 851–57. 2007.

GRIVENNIKOV, S. et al. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and?? Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* 15(2): 103–13. 2009.

GROVES, R. W. et al. Inflammatory Skin Disease in Transgenic Mice That Express High Levels of Interleukin 1 Alpha in Basal Epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(25): 11874–78. 1995.

GUERRY, D. et al. Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J Invest Dermatol.* 100(3):342S-345S. 1993.

HAN, Y.P. et al. TNF-alpha stimulates activation of pro- MMP2 in human skin through NF-(kappa) B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 114, 2001.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer. *Cell* 100(1): 57-70. 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* 144(5): 646–74. 2011.

HAGHNEGAHDAR, H. et al. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. *J Leukocyte Biol.* 67:53 – 62. 2000.

HAYDN, J. M. et al. The MAPK Pathway as an Apoptosis Enhancer in Melanoma. 5(13). 2014.

HILLIQUIN, P. Biological markers in inflammatory rheumatic diseases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 41:993–1006. 1995.

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* 128(11): 2575–95. 2008.

HORSSSEN, R. V.; HAGEN, T. L. M.; EGGERMONT, A. M. M. TNF- $\alpha$  in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *The Oncologist* 11: 397–408. 2006.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)> 2016a.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_ao\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_ao_melanoma)>. 2016b.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Disponível em <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma)> 2016c.

KATERINAKI, E. et al. TNF-Alpha Increases Human Melanoma Cell Invasion and Migration in Vitro: The Role of Proteolytic Enzymes. *British journal of cancer* 89(6): 1123–29. 2003.

KEE, D.; MCARTHUR, G. Targeted Therapies for Cutaneous Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 28(3): 491–505. 2014.

KIM, C. S. et al. Circulatin levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int. J Obes.* 30(9):1347-55. 2006.



- KHALILI, J. S. et al. Oncogenic BRAF(V600E) Promotes Stromal Cell-Mediated Immunosuppression via Induction of Interleukin-1 in Melanoma. *Clinical Cancer Research* 18(19): 5329–40. 2012.
- KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: Gearing the Journey to Cancer. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 659(1-2): 15–30. 2008.
- LABRIE, F.; LUU, V; LABRIE, C. Intracrinology and the skin. *Horm Res.* 54:218–29. 2000.
- LAMARRE, N. S. et al. Effect of Obese and Lean Zucker Rat Sera on Human and Rat Prostate Cancer Cells: Implications in Obesity-Related Prostate Tumor Biology. *Urology* 69(1): 191–95. 2007.
- LANDSKRON, G. et al. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. 2014.
- LAPPALAINEN, T. et al. Serum concentrations and expressions of serum amyloid A and leptin in adipose tissue are interrelated: the Genobin Study. *Eur J Endocrinol.* 158(3):333-41. 2008.
- LEDERLE, W. et al. IL-6 Promotes Malignant Growth of Skin SCCs by Regulating a Network of Autocrine and Paracrine Cytokines. *International Journal of Cancer* 128(12): 2803–14. 2011.
- 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. *British Journal of Dermatology* 164(4): 776–84. 2011.
- LEITER, U., GARBE, C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer – the role of sunlight. *Sunlight, Vitamin D and Skin cancer*. V. 624. P. 89-103. Editora Springer. New York. 2008.
- LINARES, M. A., ZAKARIA, A., NIZRAN, P. *Skin cancer. Primary care: Clinics in office practice*, v. 42, p. 645-59. 2015.
- LIN, E.Y. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Restores Delayed Tumor Progression in Tumors Depleted of Macrophages. *Molecular Oncology* 1(3): 288–302. 2007.

LIU, X. et al. REG3A Accelerates Pancreatic Cancer Cell Growth under IL-6-Associated Inflammatory Condition: Involvement of a REG3A-JAK2/STAT3 Positive Feedback Loop. *Cancer Letters* 362(1): 45–60. 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25(4): 402–8. 2001.

LORUSSO, G.; RÜEGG, C. The Tumor Microenvironment and Its Contribution to Tumor Evolution toward Metastasis. *Histochemistry and Cell Biology* 130(6): 1091–1103. 2008.

LU, H. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. *Molecular Cancer Research* 4(4): 221–33. 2006.

MADAN, V.; LEAR, J. T.; SZEIMIES, R. Non-Melanoma Skin Cancer. *The Lancet* 375(9715): 673–85. 2010.

MANTOVANI, A et al. The Origin and Function of Tumor-Associated Macrophages. *Immunology today* 13(7): 265–70. 1992.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage Polarization: Tumor-Associated Macrophages as a Paradigm for Polarized M2 Mononuclear Phagocytes. *Trends in Immunology* 23(11): 549–55. 2002.

MANTOVANI, A. et al. Role of Tumor-Associated Macrophages in Tumor Progression and Invasion. *Cancer metastasis reviews* 25(3): 315–22. 2006.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-Related Inflammation. *Nature* 454(7203): 436–44. 2008.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage Plasticity and Polarization in Tissue Repair and Remodelling. *The Journal of Pathology* 229(2): 2013.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity* 23(4): 344–46. 2005.

MANTZOROS C. S. et al. Circulating adiponectin levels in relation to melanoma: a case-control study. *Eur J Cancer*. 43:1430–6. 2007.

MARU, G. B; GANDHI, K.; RAMCHANDANI, A. The role of inflammation in skin cancer. Chapter 17. *Inflammation and Cancer*. 2014.

MEIER, F. et al. Combined Targeting of MAPK and AKT Signalling Pathways Is a Promising Strategy for Melanoma Treatment. *Brit J Dermat*. 156(6):1204-1213. 2007.

MEC. MELANOMA EDUCATION FOUNDATION. Lesões cutâneas do melanoma. Disponível em: <<http://www.skincheck.org/Page2.php#characteristics>>. Acesso em: 3 de fev de 2016.

MOFLEH, A. I. A. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol*. 14:675–684. 2008.

MOORE, R. J. et al. Mice Deficient in Tumor Necrosis Factor-Alpha Are Resistant to Skin Carcinogenesis. *Nature medicine* 5(7): 828–31. 1999.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation. *Nature Reviews Immunology* 8(12): 958–69. 2008.

MUELLER, L. et al. TNF- $\alpha$  Similarly Induces IL-6 and MCP-1 in Fibroblasts from Colorectal Liver Metastases and Normal Liver Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397(3): 586–91. 2010.

MUELLER, M. M. Inflammation in Epithelial Skin Tumours: Old Stories and New Ideas. *European journal of cancer (Oxford, England)* : 1990) 42(6): 735–44. 2006.

NICKOLOFF, B. J.; BEN-NERIAH, Y.; PIKARSKY, E. Inflammation and Cancer: Is the Link as Simple as We Think? *Journal of Investigative Dermatology* 124(6): x – xiv. 2005.

NING, Y.; WANG, L.; GIOVANUCCI, E. L. A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obes Rev.* 11(1):19-30. 2010.

OH, S. W.; YOON, Y. S.; SHIN, S. A. Effects of excess weight on cancer incidences depending on cancer sites and histologic findings among men: Korea National Health Insurance Corporation Study. *J Clin Oncol.* 23:4742–54. 2005.

PAHL, H. L. Activators and Target Genes of Rel/NF-kappaB Transcription Factors. *Oncogene* 18(49): 6853–66. 1999.

PALMIERI, G. et al. Multiple molecular pathways in melanomagenesis characterization of therapeutic targets. *Front in Onc.* v. 5: 183. 2015.

PARAISO, K H T; JOBIN, K J; SMALLEY, K. S. M. Melanoma and Other Skin Cancers. *Biortargets of Cancer in Current Clinical Practice*, pg 439 - 468, 2012.

PARK, M. T., LEE, S. J. Cell cycle and cancer. *J Bio Mol Biology.* V. 36, n. 1, p. 60-65, 2003.

PARKIN, D. M. The Global Health Burden of Infection-Associated Cancers in the Year 2002. *International Journal of Cancer* 118(12): 3030–44. 2006.

PARRY, G. C. et al. IL-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in endothelial cells is blocked by proteasome inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18(6):934-40. 1998.

PERGOLA, G.; SILVESTRIS, F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *Journal of Obesity.* 2013.

PISCHON, T.; NOTHLINGS, U.; BOEING, H. Obesity and cancer. *Proc of the Nut Society.* v. 67. p 128-145. 2008.

PRASAD, S.; RAVINDRAN, J.; AGGARWAL, B. B. NF-κB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem* 336(1–2):25–37. 2010.

PRICE, R. S. et al. Obesity-Related Systemic Factors Promote an

Invasive Phenotype in Prostate Cancer Cells. *Prostate cancer and prostatic diseases* 15(2): 135–43. 2012.

PUCK, T.T. e MARCUS, P.I. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 103 (5), 653-666, 1956.

QIN, Y. et al. Constitutive Aberrant Endogenous Interleukin-1 Facilitates Inflammation and Growth in Human Melanoma. *Molecular cancer research* □ : *MCR*9(11): 1537–50. 2011.

RAFEHI H. et al. Clonogenic Assay: Adherent Cells. *JoVE*. 49, 2011.

RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview - The adipocyte- at the crossroads of energy homeostasis, inflammation and atherosclerosis. *Endocrinology*. v. 144. p. 3765-73. 2003.

RAU, B. M. Predicting severity of acute pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 9:107–115. 2007.

RAU, B. M.; SCHILLING, M. K.; BEGER, H. G. Laboratory markers of severe acute pancreatitis. *Dig Dis*. 22(3):247-57. 2004.

RENEHAN A. G. et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*;371: 569–78. 2008.

RIBAS, A.; FLAHERTY, K. T. BRAF Targeted Therapy Changes the Treatment Paradigm in Melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* 8(7): 426–33. 2011.

ROBERTS, D. L.; DIVE, C.; RENEHAN, A. G. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. *Annu. Rev. Med.* 61:301–16. 2010.

RUNDHAUG, J. E.; FISCHER, S. M. Molecular Mechanisms of Mouse Skin Tumor Promotion. *Cancers* 2(2): 436–82. 2010.

RUTHERFORD, M. S.; WITSELL, A.; SCHOOK, L. B. Mechanisms Generating Functionally Heterogeneous Macrophages: Chaos Revisited. *Journal of leukocyte biology* 53(5): 602–18. 1993.

SAMANIC, C. et al. Obesity and cancer risk among white and black United States veterans. *Cancer Causes Control*;15:35–43. 2004.

SCHAEFFER, H. J.; WEBER, M. J. MINIREVIEW Mitogen-Activated Protein Kinases □ : Specific Messages from Ubiquitous Messengers. 19(4): 2435–44. 1999.

SERGEANTANIS, T. N. et al. Obesity and Risk of Malignant Melanoma: A Meta-Analysis of Cohort and Case-Control Studies. *European Journal of Cancer* 49(3): 642–57. 2013.

SHARMA, S. D.; KATIYAR, S. K. Leptin deficiency-induced obesity exacerbates ultraviolet B radiation-induced cyclooxygenase-2 expression and cell survival signals in ultraviolet B-irradiated mouse skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 244:328–35. 2010.

SHI, V. Y.; OLNEY, L. P.; KLOXIN, A. M. MEK Inhibitors and Their Potential in the Treatment of Advanced Melanoma □ : The Advantages of Combination Therapy. 43–52. 2016.

SHIAO, S. L. et al. Immune Microenvironments in Solid Tumors □ : New Targets for Therapy Immune Microenvironments in Solid Tumors □ : New Targets for Therapy. 2559–72. 2011.

SICA, A.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Cancer Related Inflammation: The Macrophage Connection. *Cancer Letters* 267(2): 204–15. 2008.

SICA, A. et al. Tumour-Associated Macrophages Are a Distinct M2 Polarised Population Promoting Tumour Progression: Potential Targets of Anti-Cancer Therapy. *European Journal of Cancer* 42(6): 717–27. 2006.

SOLINAS, G. et al. Tumor-Associated Macrophages (TAM) as Major Players of the Cancer-Related Inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 86(5): 1065–73. 2009.

SUN, Y. et al. Signaling Pathway of MAPK / ERK in Cell Proliferation , Differentiation , Migration , Senescence and Apoptosis. 9893. 2016.

SZLOSAREK, P.; CHARLES, K. A.; BALKWILL, F. Tumour Necrosis

Factor- $\alpha$  As a Tumour Promoter. *European Journal of Cancer* 42(6): 745–50. 2006.

THE NATIONAL CANCER INSTITUTE. Layers of the skin. Disponível em: <[www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq](http://www.cancer.gov/types/skin/patient/melanoma-treatment-pdq)> . Acesso em 2 de fev de 2016.

TRAN, S. E. F. et al. MAPK/ERK Overrides the Apoptotic Signaling from Fas, TNF, and TRAIL Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 276(19): 16484–90. 2001.

VONA-DAVIS, L., ROSE, D.P. Angiogenesis, adipokines and breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20:193–201, 2009.

VU, H. L. et al. MIG6 Is MEK Regulated and Affects EGF-Induced Migration in Mutant NRAS Melanoma. *J Invest Dermat.* 136 (2). 453–63. 2016.

WAN, P. T. C. et al. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855–67. 2004.

WHO , *World Health Organization.* Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> 2015a.

WHO , *World Health Organization.* Disponível em <[http://www.who.int/uv/health/uv\\_health2/en/index1.html](http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html)> 2015b.

WOLIN, K. Y.; COLDITZ, G. A. Can Weight Loss Prevent Cancer? *British journal of cancer* 99(7): 995–99. 2008.

WOLIN, K. Y.; CARSON, K.; COLDITZ, G. A. Obesity and Cancer. *The Oncologist* 15(6): 556–65. 2010.

WOZNIAK, S. E. et al. Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article. *Digestive Diseases and Sciences* 54(9): 1847–56. 2009.

YAMADA, T. Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness. *Clin Chem & Lab Med.* 37:381–8. 1999.

YAMADA, T. Serum amyloid A (SAA)–pathogenicity and implication of appearance in plasma. *Rinsho Byori* 54:509–512. 2006.

YANG, L. et al. 23,24-Dihydrocucurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). *Cancer Letters*, v. 256, n. 2, p. 267-78, 2007.

YU, N. et al. Serum amyloid A induces interleukin-1 $\beta$  secretion from keratinocytes via the NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 inflammasome. *Clin Exp Immunol.* 179 (2): 344-53. 2015.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.; MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. *The Journal of investigative dermatology* 128(10): 2381–91. 2008.

ZHANG, Y. et al. White Adipose Tissue Cells Are Recruited by Experimental Tumors and Promote Cancer Progression in Mouse Models. *Cancer Research* 69(12): 5259–66. 2009.

ZHU, N. et al. Melanoma Cell Migration Is Upregulated by Tumour Necrosis Factor-Alpha and Suppressed by Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone. *British journal of cancer* 90(7): 1457–63. 2004.

ZHU, Z.; ZHONG, S.; SHEN, Z. Targeting the inflammatory pathways to enhance chemotherapy of cancer. *Cancer Biol Ther.* 12(2):95–105. 2011.



## APÊNDICE A – Reagentes

### Tabela de reagentes

Ácido etanossulfônico de hidroxietil-piperazina	Hepes	<sup>6</sup> Ludwig®
Albumina sérica bovina	BSA	<sup>9</sup> Sigma®
Álcool etílico	C2H6O	<sup>7</sup> Merck®
Álcool isopropílico	C3H8O	<sup>7</sup> Merck®
Azul de Tripan	-	<sup>9</sup> Sigma®
Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	<sup>5</sup> LAFAN®
Cloreto de potássio	KCl	<sup>12</sup> Vetec®
Cloreto de sódio	NaCl	<sup>12</sup> Vetec®
Clorofórmio	CHCl <sub>3</sub>	<sup>7</sup> Merck®
Dimetilsulfóxido	DMSO	<sup>10</sup> Synth®
DNase kit	-	<sup>11</sup> Thermo Scientific®
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM	<sup>3</sup> Gibco®
Fator de crescimento epidermal recombinante	EGF	<sup>9</sup> Sigma®
Fator de Necrose Tumoral alfa recombinante	TNF- $\alpha$	<sup>1</sup> BD-Biosciences®
Fator quimiotático de macrófagos 1 recombinante	MCP-1	<sup>1</sup> BD-Biosciences®
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	-	<sup>4</sup> Invitrogen®
Interleucina 1 beta recombinante	IL-1 $\beta$	<sup>1</sup> BD-Biosciences®
Interleucina 6 recombinante	IL-6	<sup>1</sup> BD-

<b>Biosciences®</b>	
<b>Iodeto de propídio</b>	<b>PI</b> <sup>9</sup> <b>Sigma®</b>
<b>Penicilina/estreptomicina</b>	- <sup>2</sup> <b>Cultilab®</b>
<b>RNase</b>	- <sup>8</sup> <b>Promega®</b>
<b>Proteína amiloide sérica A recombinante</b>	<b>SAA</b> <sup>9</sup> <b>Sigma®</b>
<b>Soro Fetal Bovino</b>	<b>SFB</b> <sup>2</sup> <b>Cultilab®</b>
<b>SYBR-Green PCR Master Mix</b>	- <sup>11</sup> <b>Thermo Scientific®</b>
<b>Tripsina</b>	- <sup>2</sup> <b>Cultilab®</b>
<b>Triton X-100</b>	- <sup>9</sup> <b>Sigma®</b>
<b>TRIzol</b>	- <sup>4</sup> <b>Invitrogen®</b>

**Notas:**

<sup>1</sup>BD-Biosciences, San Jose, California, EUA

<sup>2</sup>Cultilab, Campinas, SP, Brasil

<sup>3</sup>Gibco Corporation, Grand Island, NY, EUA

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

<sup>5</sup>LAFAN Química Fina, Várzea Paulista, SP, Brasil

<sup>6</sup>Ludwig Biotecnologia Ltda., Alvorada, RS, Brasil

<sup>7</sup>Merck, Darmstadt, German

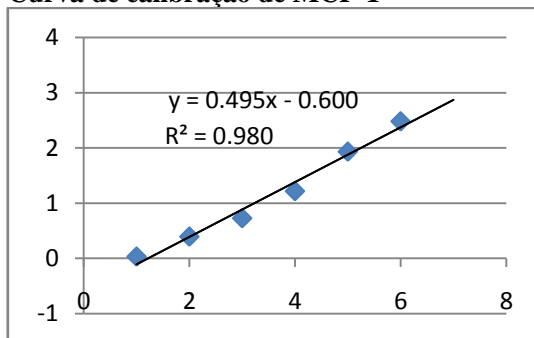
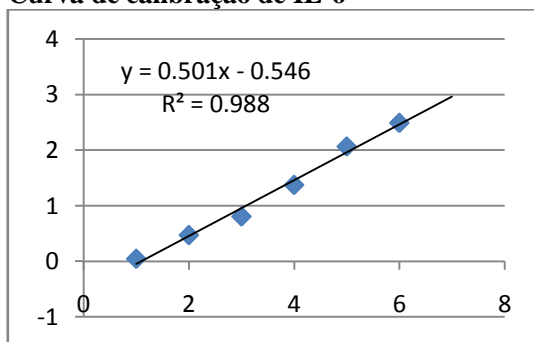
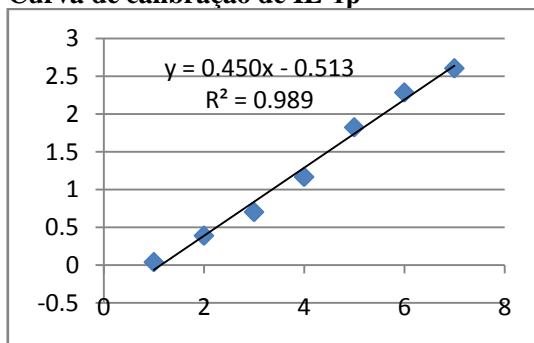
<sup>8</sup>Promega Corporation, Mad EUA

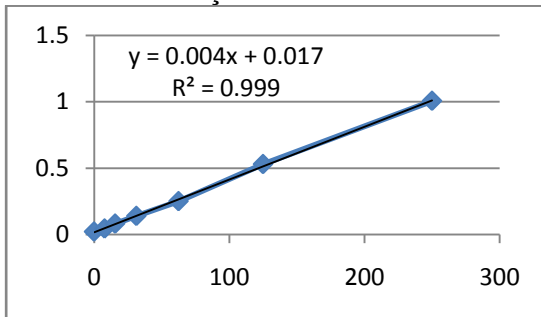
<sup>9</sup>Sigma-Aldrich Corporate, St Louis, MO, EUA

<sup>10</sup>Synth, Diadema, SP, Brasi

<sup>11</sup>Thermo Scientific, Waltha MA, EUA

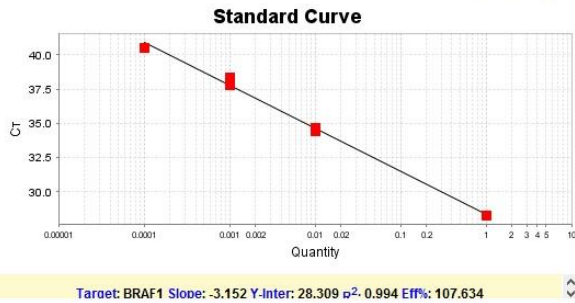
<sup>12</sup>VETEC, Química Fina Ltc Duque de Caxias, RJ, Brasil

**APÊNDICE B – Curvas de calibração ELISA****Curva de calibração de MCP-1****Curva de calibração de IL-6****Curva de calibração de IL-1 $\beta$** 

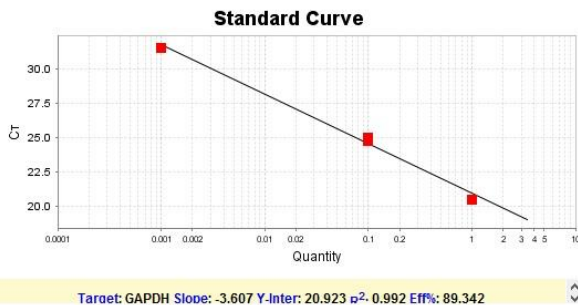
**Curva de calibração de TNF- $\alpha$** 

## APÊNDICE C – Curva de eficiência dos Primers do PCR

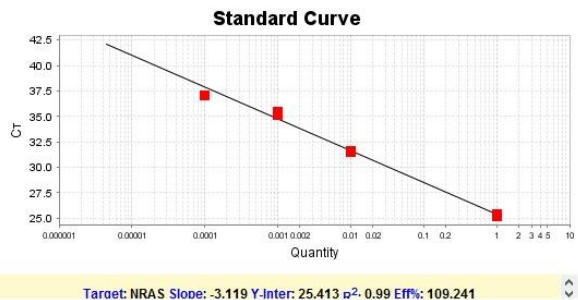
### Curva de eficiência de B-RAF



### Curva de eficiência de GAPDH



### Curva de eficiência de N-RAS



## APÊNDICE D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) Senhor(a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda porque esta pesquisa está sendo realizada. Por favor, leia com atenção todas as informações e se desejar, discuta com sua família, para que a sua participação possa ser uma decisão bem informada.

Este impresso contém informações para a participação voluntária do(a) Senhor(a) neste estudo, que servirá para avaliar os melhores exames a serem realizados durante o tratamento da obesidade. A obesidade grave é tratada com cirurgia de redução de estômago e de modificação do intestino. O acompanhamento por diversos médicos se faz necessário antes e depois do procedimento. Mas, atualmente, o acompanhamento de exames de laboratório (os exames de sangue) desses pacientes precisa ser melhorado para que o tratamento seja eficiente. A fim de avaliar os melhores exames laboratoriais no acompanhamento nos períodos antes e depois da cirurgia bariátrica no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) gostaríamos de convidá-lo a participar do estudo intitulado **“Acompanhamento de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica: aspectos laboratoriais nos períodos pré e pós operatório”**.

#### **Qual objetivo deste estudo?**

Nós esperamos que este estudo ajude no acompanhamento dos pacientes que fazem a cirurgia para o tratamento da obesidade para a diminuição das complicações e os custos hospitalares neste serviço de saúde.

#### **Eu tenho que participar?**

Cabe ao Senhor(a) decidir se irá ou não participar. Mesmo que o(a) Senhor(a) não queira participar do estudo, o(a) Senhor(a) não terá nenhuma desvantagem em relação ao tratamento médico e aos cuidados que tenha direito a receber. Se decidir participar, o(a) Senhor(a) irá assinar este Termo de Consentimento. Mesmo após ter assinado, é garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento no HU/UFSC. Caso aceite participar, será coletada uma amostra de sangue do(a) Senhor(a) no HU/UFSC para avaliação laboratorial. Além disso, seus dados de prontuário serão utilizados para a pesquisa.

#### **Existem riscos ou desconfortos associados com a participação?**

Sim, existem os riscos de procedimentos de coleta de sangue, possíveis constrangimentos durante a entrevista e/ou quebra de confidencialidade dos dados coletados. No entanto, estes riscos serão potencialmente reduzidos pelos pesquisadores: A coleta de sangue será realizada em ambiente adequado e pela equipe da pesquisa que tomará todos os cuidados necessários para que o (a) Senhor(a) tenha o mínimo de desconforto. Apesar disto, poderá haver a possibilidade de formação de hematoma (manchas escuras) e sensação dolorosa no local da coleta. Se isso acontecer, a equipe da pesquisa tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto. A entrevista para a coleta de algumas informações (uso de medicamentos, hábitos alimentares e situação socioeconômica) será realizada em ambiente tranquilo e discreto, sempre respeitando a individualidade e as necessidades de cada paciente. Será assegurado o direito a não responder a qualquer pergunta se achar que ela é muito pessoal ou se sentir desconfortável em falar. Os dados retirados do prontuário médico serão armazenados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo.

#### **Meus dados serão divulgados?**

Se o(a) Senhor(a) estiver de acordo em participar do estudo, as informações fornecidas serão confidenciais e só serão utilizadas neste trabalho com a finalidade de gerar conhecimento em saúde. Apenas o pesquisador e os colaboradores terão acesso aos dados. Não serão tiradas fotos, nem realizadas filmagens ou qualquer tipo de gravação. As

informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

**Quais são os benefícios esperados com a pesquisa para o participante?**

Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente com os resultados da pesquisa, informo-lhe que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhor compreensão do processo de emagrecimento e essas informações poderão contribuir para uma melhor abordagem clínica e laboratorial dos pacientes que fazem a cirurgia bariátrica. Ainda, todos os resultados dos exames que iremos realizar serão disponibilizados ao(a) Senhor(a) e, se necessário, será (a) o senhor (a) será encaminhado para a equipe médica da Unidade do HU/UFSC para acompanhamento.

**Terei custos se participar?**

Não há despesas pessoais para o(a) Senhor(a) em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação na pesquisa.

**Com quem devo entrar em contato se necessitar de mais informações?**

Este estudo está sendo realizado no HU/UFSC, situado no bairro Trindade, município de Florianópolis - SC. A pesquisadora principal é farmacêutica e professora do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os principais investigadores são as Professoras Fabiola Monteiro e Liliete Souza, que podem ser encontrados no Departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC, pelos telefones (48) 3721-9712 e 9911-4480, ou através do email: [fabiola.monteiro@ufsc.br](mailto:fabiola.monteiro@ufsc.br).

Ainda, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC encontra-se Biblioteca Universitária Central - Setor de Periódicos (térreo), Pró-Reitoria de Pesquisa, Campus Universitário, Trindade, ou pelo contato telefônico (48) 3721-9206, ou e-mail [cep.propesq@contato.ufsc.br](mailto:cep.propesq@contato.ufsc.br).

Segue os termos da declaração para poder participar do estudo:

Eu, \_\_\_\_\_ confirmo que:

Recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa. Tive a oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo. Estou ciente de que doarei uma amostra de sangue, a qual será destinada para a pesquisa. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Concordo em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Paciente ou representante legal

\_\_\_\_\_  
Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Fabiola Branco Filippin Monteiro

\_\_\_\_\_  
Data

Responsável pelo estudo

CPF 027.645.219-44

## APÊNDICE E – Parecer do comitê de ética aprovado pela Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC



UNIVERSIDADE DO ESTADO  
DE SANTA CATARINA - UDESC



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA BARIÁTRICA: ASPECTOS LABORATORIAIS NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-OPERATÓRIO

**Pesquisador:** Fabiola Branco Filippin Monteiro

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 24279013.7.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 701.185

**Data da Relatoria:** 26/06/2014

#### Apresentação do Projeto:

Esse projeto encontra-se na Versão 3 para adequações de pendências. Anteriormente submetido no CEP da UFSC. Trata o processo de um projeto submetido à Chamada Pública FAPESC número 07/2013 MS DECIT/CNPq/SES-SC. Sob coordenação da Dr<sup>a</sup> Fabiola Branco Filippin-Monteiro, do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, que assina a folha de rosto como responsável, junto com o diretor do Hospital Universitário da UFSC.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar analitos séricos envolvidos no processo fisiopatológico da obesidade e acompanhá-los durante o processo de reversão da obesidade e de suas comorbidades por meio de aspectos relacionados:

- (i) à inflamação crônica e persistente decorrente da hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo e,
- (ii) as consequências da perda de peso do ponto de vista das adipocinas e citocinas pró-inflamatórias.

Ainda, a partir desta avaliação, elaborar um acompanhamento laboratorial longitudinal dos

**Endereço:** Av. Madre Benvenutta, 2007

**Bairro:** Itacorubi

**CEP:** 88.035-001

**UF:** SC

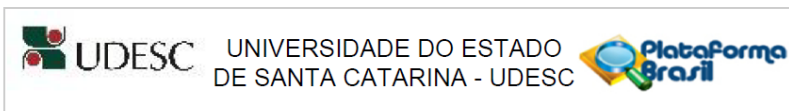
**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3321-8195

**Fax:** (48)3321-8195

**E-mail:** cepsh.reitoria@udesc.br





Continuação do Parecer: 701.185

biomarcadores relevantes ao processo de reversão da obesidade após cirurgia bariátrica de pacientes com obesidade grau III e obesidade mórbida.

Objetivos Secundários:

Determinar as concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios e adipocinas no soro dos pacientes nos períodos pré e pós-operatório; Identificar as comorbidades dos pacientes a partir de biomarcadores laboratoriais e reavaliá-los após a cirurgia bariátrica em períodos previamente definidos; Estimar os custos relacionados ao acompanhamento laboratorial dos marcadores gerais e específicos obesidade e de sua reversão após intervenção cirúrgica; Propor um acompanhamento laboratorial direcionado ao processo de obesidade e de suas comorbidades.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

No Projeto Básico da Plataforma Brasil e no TCLE é informado sobre os riscos para os indivíduos participantes da pesquisa, descrevendo-os, bem como as medidas que serão adotadas visando minimizá-los.

Os benefícios são descritos no TCLE como sendo indiretos se considerado o sujeito da pesquisa, uma vez que os "resultados poderão contribuir futuramente para melhor compreensão do processo de emagrecimento e essas informações poderão contribuir para uma melhor abordagem clínica e laboratorial dos pacientes que fazem a cirurgia bariátrica" conclui a pesquisadora. Entretanto, ao realizar a leitura do projeto é possível observar de que haverá benefício direto através dos testes diagnósticos que a pesquisadora propõe efetuar e na afirmação de que esses (testes) poderão indicar novas abordagens terapêuticas. Entretanto, menciona de que o participante receberá os resultados dos exames de sangue e se necessário será encaminhado a equipe médica do HU/UFSC, fazendo entender que se trata de um benefício direto.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta mérito acadêmico/científico, sendo relevante para a promoção da saúde e prevenção de doenças na área da saúde pública. Encontra-se bem estruturado metodologicamente. Informa que a seleção dos sujeitos da pesquisa, divididos em dois grupos, assim descritos: Grupo de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica = 80 sujeitos com a intervenção de coleta de amostra - sangue e o Grupo de indivíduos saudáveis: 40 sujeitos também com a intervenção através da Coleta de amostra - sangue.

**Endereço:** Av. Madre Benvenutta, 2007  
**Bairro:** Itacorubi **CEP:** 88.035-001  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3321-8195 **Fax:** (48)3321-8195 **E-mail:** cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO  
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 701.185

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Constam na Plataforma os documentos solicitados para a submissão do projeto:

- 1) Folha de rosto devidamente assinada;
- 2) Formulário Projeto da Pesquisa - PB, sem nomear os riscos aos sujeitos participantes da pesquisa; não menciona como e onde serão recrutados os sujeitos saudáveis (40) participantes;
- 3) Projeto de Pesquisa estruturado na íntegra;
- 4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido atendendo ao Parecer CONSUBSTANCIADO do CEP/UFSC;
- 5) Declaração de concordância expedida pela instituição;
- 6) A carta resposta ao CEP sobre as adequações solicitadas no Parecer Consubstanciado número 550.795 emitido em 10/03/2014.
- 7) Carta resposta ao CEP/UDESC sobre as adequações solicitadas no Parecer Consubstanciado N° 694.974 emitido em 13/06/2014.

**Recomendações:**

Sem recomendação.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

**CUMPRIMENTO AS PENDÊNCIAS:**

De acordo com a Resolução 466/2012 em relação à elaboração do TCLE, devem ser observadas as seguintes condições: Toda pesquisa com seres humanos envolve risco em tipos e gradações variados. Quanto maiores e mais evidentes os riscos, maiores devem ser os cuidados para minimizá-los e a proteção oferecida pelo Sistema CEP/CONEP aos participantes. Devem ser analisadas possibilidades de danos imediatos ou posteriores, no plano individual ou coletivo. A análise de risco é componente imprescindível à análise ética, dela decorrendo o plano de monitoramento que deve ser oferecido pelo Sistema CEP/CONEP em cada caso específico.

#apesar de ter sido elaborado um novo TCLE, este afirma que "não há riscos além do desconforto da coleta de sangue", desconsiderando outros riscos previstos pela Resolução 466/2012. PENDÊNCIA CUMPRIDA - nas adequações do novo TCLE os riscos são informados e descritas todas as medidas de (dis)estresse que serão tomadas caso ocorra algum desconforto durante a pesquisa na fase de coleta dos dados.

**CUMPRIMENTO DAS NOVAS PENDÊNCIAS:**

**Endereço:** Av. Madre Benvenutta, 2007

**Bairro:** Itacorubi

**CEP:** 88.035-001

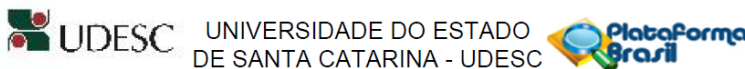
**UF:** SC

**Município:** FLORIANOPOLIS

**Telefone:** (48)3321-8195

**Fax:** (48)3321-8195

**E-mail:** cepsh.reitoria@udesc.br



Continuação do Parecer: 701.185

a) Informar no Projeto Básico da Plataforma Brasil os riscos e as medidas que serão tomadas para minimizá-los, tal como constatado no TCLE; PENDÊNCIA CUMPRIDA ao informar no protocolo do Projeto Básico os riscos inerentes à coleta de sangue e pela entrevista. Descrito quais os desconfortos físicos e emocionais derivados no momento da coleta dos dados, bem como as medidas que serão tomadas visando minimizar ao máximo tais desconfortos.

b) Descrever o local e como serão selecionados os sujeitos saudáveis informado na proposta e no Grupo ID - PENDÊNCIA CUMPRIDA. Descrição feita no Projeto detalhado campo: Seleção e recrutamento dos indivíduos voluntários - Indivíduos saudáveis. Informa de que a seleção será efetuada àqueles pertencentes à Comunidade Universitária e serão convidados pela equipe técnica do projeto a participar do estudo pela equipe técnica do projeto e se aceitarem participar da pesquisa, assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

c) Caracterizar e justificar o uso de sujeitos saudáveis - PENDÊNCIA CUMPRIDA. Justificativa encontra-se no Projeto detalhado.

d) Rever e inserir no TCLE e no Projeto Básico, por tratar-se de Teste Diagnóstico, os encaminhamentos imediatos dos resultados laboratoriais (sangue) para o médico do paciente e ao próprio paciente, visando atender a Resolução 251/97 item 3.2.i que dispõe sobre pesquisa na área temática de novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos: "o pesquisador responsável deverá dar acesso aos resultados de exame e de tratamento ao médico do paciente e ou próprio paciente sempre que solicitado e ou indicado" solicita-se inserir essa informação ao TCLE e no Projeto Básico. PENDÊNCIA CUMPRIDA. Descrito na projeto detalhado, no projeto básico e no de que o participante receberá os resultados do exame de sangue, assim informado; "todos os resultados dos exames que iremos realizar serão disponibilizados ao(a) Senhor(a) e, se necessário, será (a) o senhor (a) será encaminhado para a equipe médica da Unidade do HU/UFSC para acompanhamento".

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. Madre Benvenutta, 2007  
**Bairro:** Itacorubi **CEP:** 88.035-001  
**UF:** SC **Município:** FLORIANOPOLIS  
**Telefone:** (48)3321-8195 **Fax:** (48)3321-8195 **E-mail:** cepsh.reitoria@udesc.br

## APÊNDICE F – Caracterização dos indivíduos obesos

Obesos (n=10)	
<b>Masculino:feminino</b>	2:8
<b>Idade</b>	52 (31 - 61)
<b>Peso(kg)</b>	120 (105 - 192)
<b>IMC</b>	47,94 (37,74 - 57,05)
<b>TG (mg/dL)</b>	189 (87 - 423)
<b>LDL (mg/dL)</b>	104 (56 - 185)
<b>HDL (mg/dL)</b>	36 (20 - 42)
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	98 (86 - 129)
<b>Insulina (µIU/mL)</b>	23,4 (9,4 - 56,4)
<b>PCR (mg/dL)</b>	8,4 (1,62 - >11,1)

	<b>Peso (kg)</b>	<b>IMC</b>	<b>TG (mg/dL)</b>	<b>HDL (mg/dL)</b>	<b>LDL (mg/dL)</b>
<b>O1</b>	175	55,85	205	42	185
<b>O2</b>	106,6	40,39	87	34	154
<b>O3</b>	105	37,74	189	33	164
<b>O4</b>	192	57,05	161	32	135
<b>O5</b>	120	44,03	308	36	56
<b>O6</b>	143	52,52	109	40	68
<b>O7</b>	121	41,86	-	-	-
<b>O8</b>	112	47,2	100	38	99
<b>O9</b>	120	48,68	423	20	104
<b>O10</b>	118	49,75	203	37	90

	<b>Glicemia (mg/dL)</b>	<b>Insulina (µIU/mL)</b>	<b>PCR (mg/dL)</b>
<b>O1</b>	-	22,8	8,4
<b>O2</b>	86	9,4	9,1
<b>O3</b>	127	24,7	>11,1
<b>O4</b>	129	56,4	>11,1
<b>O5</b>	89	10,4	9,19
<b>O6</b>	92	42,6	1,62
<b>O7</b>	-	-	-
<b>O8</b>	116	23,4	3,1
<b>O9</b>	93	20,4	7,7
<b>O10</b>	104	83,7	>11,1

	<b>MCP-1</b> <b>(pg/mL)</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b> <b>(pg/mL)</b>	<b>IL-6</b> <b>(pg/mL)</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> <b>(pg/mL)</b>	<b>SAA</b> <b>(ng/mL)</b>
<b>O1</b>	31,3	ND	ND	ND	107,3
<b>O2</b>	20,0	ND	ND	ND	15,6
<b>O3</b>	12,6	ND	ND	ND	204
<b>O4</b>	59,8	ND	ND	ND	150,6
<b>O5</b>	26,6	ND	ND	ND	124
<b>O6</b>	9,5	ND	ND	ND	647,3
<b>O7</b>	16,4	ND	ND	ND	1300,6
<b>O8</b>	42,2	ND	ND	ND	1882,3
<b>O9</b>	21,1	ND	ND	ND	532,3
<b>O10</b>	21,9	ND	ND	ND	1909

## APÊNDICE G – Apresentação de trabalhos

**MOCELLIN, D.**; BRATTI, L. O. S. ; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B. In vitro effects of cytokine-rich serum on B-RAF mutated melanoma cell line. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

**MOCELLIN, D.**; BRATTI, L. O. S. ; KRETZER, I. F.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. ; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B. . In vitro effects of cytokine-rich serum on B-RAF mutated melanoma cell line. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**MOCELLIN, D.**; KRETZER, I. F.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. ; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B. . Efeitos in vitro das proteínas TNF- $\alpha$  e EGF em linhagens celulares de melanoma. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).