

Nádia Cristina Falcão Bucker

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE UM NOVO COMPLEXO  
MONONUCLEAR DE Ga(III) COM LIGANTE NÃO-SIMÉTRICO EM  
MODELO *IN VITRO* DE MELANOMA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Florianópolis  
2016

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

Bücker, Nádia Cristina Falcão  
POTENCIAL ANTITUMORAL DE UM NOVO COMPLEXO  
MONONUCLEAR DE Ga(III) COM LIGANTE NÃO-SIMÉTRICO EM  
MODELO in vitro DE MELANOMA / Nádia Cristina Falcão  
Bücker ; orientador, Tânia Beatriz Creczynski Pasa -  
SC, 2016.  
81 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de  
Pós-graduação em Farmácia, Florianópolis, 2016.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Antitumoral . 3.  
Antiangiogênese. 4. Complexos Mononucleares de Ga  
H3LM3 Ga. 5. Farmácia. I. Pasa, Tânia Beatriz  
Creczynski . II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.  
Título.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, meu amado Pai, que me sustentou e fortaleceu todos os dias, tornando possível a conclusão desse trabalho.

Ao meu filho Alexandre Falcão Bucker que sempre esteve do meu lado me dando força, ou melhor dentro e fora da barriga. Ao meu marido Augusto Bucker por ter me dado todo o apoio necessário, amor e paciência.

Aos meus pais Newton e Noélia Falcão pelo apoio incondicional em tudo que mais precisei nesses anos. Obrigada por sempre investirem em minha educação, e junto, o amor dedicado a mim.

À minha irmã Nívea Falcão e meu cunhado Alex Voelkner pelo amor e companheirismo.

Aos meus sogros Adelino Bucker e Iris Hoppe, obrigada por acreditarem. Obrigada aos primos, em especial Guilherme Bucker por sempre estar a disposição e ter orgulho do nosso trabalho.

A família GEIMM a qual me acolheu de braços abertos quando cheguei, o meu sincero muito obrigada amigos. Todos foram e são muito importantes para mim. O meu muito obrigada aos meus queridos Marjorie, Gabi, Leônidas, Dai e Júlia vocês foram meus parceiros de trabalho e de coração.

À Profa. Tânia Pasa a minha mais sincera gratidão, nunca esquecerei o que fez por mim, graças ao bom Deus vou poder dizer que durante esses anos na pesquisa, realmente tive uma orientadora científica e humana. Obrigada pela orientação, dedicação, apoio e amizade.

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

Ao Prof. Adailton João Bortoluzzi e sua aluna Alexandra, agradeço pela colaboração.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Paulo Dias, pela total confiança, parceria e mais que isso, ter me dado sua amizade.

Ao secretário do Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC, Bruno, obrigada pelo carinho, atenção e boa vontade.

Aos professores e colegas do Departamento de Farmácia pela amizade, ajuda e boa convivência ao longo dos anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Incluo, de forma especial, todos os meus amigos, que de uma forma ou de outra deixaram meus dias mais felizes e também contribuíram para a realização deste trabalho. Expresso a minha gratidão a todos. Este trabalho não poderia ter sido concluído sem ajuda de todos vocês.

## RESUMO

O Melanoma é encontrado na camada basal da epiderme, e consiste em uma neoplasia maligna dos melanócitos. As mutações frequentemente encontradas em pacientes com câncer são do tipo B-RAF e N-RAS. Neste sentido, ter como alvo mutações que são super expressas em linhagens tumorais de melanoma é extremamente importante para melhorar a eficiência dos tratamentos. Anos atrás medicamentos foram aprovados para auxiliar o tratamento do melanoma, porém limitações foram mostradas por pacientes como efeitos colaterais e resistência aos medicamentos. Em 2014, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou uma nova estratégia para tratamento de melanoma, o pembrolizumabe, o qual é baseado em um anticorpo monoclonal contra a proteína 1 (PD-1) relacionada a morte celular programada. Recentemente, em 2016 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou o uso do medicamento Tafinlar™ (dabrafenibe), um novo tratamento oral para pacientes com melanoma metastático ou irrissecável, oriundo de mutação positiva dos genes BRAF V600E. Embora o tratamento de melanoma tenha tornado-se um grande desafio a superar, este trabalho tem como objetivo ampliar as possibilidades terapêuticas para o melanoma, prospectando novas moléculas ativas. Especificamente, avaliou-se o potencial antitumoral e antiangiogênico de um novo complexo mononuclear de Ga(III) com ligante não-simétrico em linhagens celulares de melanoma humano (SK-MEL-28 e SK-MEL-147) com diferentes mutações e linhagem imortalizada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). O ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga apresentaram  $CC_{50}$  (concentração do composto que causa 50% de morte celular) entre 5 e 25  $\mu M$  quando expostas as linhagens tumorais, similarmente ativos quando comparados ao vemurafenibe, um quimioterápico de referência. Quando as  $CC_{50}$  destes compostos foram avaliadas em linhagens tumorais e não tumorais, não foi observada citotoxicidade para a linhagem celular não tumoral, em que 80% de células viáveis foram detectadas. Em relação a ação dos compostos sobre a atividade de caspases, os dados demonstram que não houve aumento da atividade de nenhuma das caspases, uma indicação de que a morte celular foi independente de caspases. De acordo com os resultados de um conjunto de ensaios específicos pode-se sugerir que o efeito citotóxico e antiproliferativo se dá através da indução de estresse oxidativo. Adicionalmente, foi mostrado que os compostos apresentaram atividade antimetastática, ao inibir a proliferação e invasão

celular, bem como a propriedade de bloqueio da angiogênese. O complexo mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$  sobre linhagem tumoral SK-MEL 28 apresentou a redução da expressão do gene VEGF em aproximadamente 20% em comparação ao controle. Concluindo, os compostos testados não somente apresentaram atividade citotóxica significativa, como também demonstraram efeitos anti-metastático e antiangiogênico *in vitro/in vivo*. De acordo com os dados obtidos, demonstra-se uma nova linha na exploração da atividade biológica de promissores agentes antitumorais.

**Palavras-chave:** complexo mononuclear, melanoma, citotoxicidade, expressão de VEGF, atividade antimetastática, atividade antiangiogênica.

## ABSTRACT

Melanoma is found in the basal layer of the epidermis and consists in a malignant tumor of melanocytes. Mutations often found in patients with cancer are B-RAF and N-RAS type. Thus, targeting mutations which are super expressed in tumor melanoma strains are extremely important to improve the treatment efficacy. Years ago drugs were approved to help the melanoma treatment, however, some limitations were shown by patients such as side effects and drug resistance. In 2014 the FDA (Food and Drug Administration) approved a new strategy to treat melanoma, the pembrolizumab, which is based on a monoclonal antibody against protein 1 (PD-1) related to programmed cell death. Recently, in 2016 the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) approved the use of the drug Tafinlar™ (dabrafenib), a new oral treatment for patients with metastatic or unresectable melanoma, from a positive mutation of BRAF V600E genes. Although the melanoma treatment became a great challenge to overcome, this work aims to broaden the therapeutic possibilities for melanoma by prospecting new active molecules. Specifically, antitumor and antiangiogenic potential of a novel mononuclear Ga(III) complex with the non-symmetric ligand in human melanoma cell lines (SK-MEL-28 and SK-MEL-147) was assessed with different mutations and immortalized lineage of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). The non-symmetric linker H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> and the mononuclear H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga complex showed CC<sub>50</sub> (compound concentration causing 50% cell death) between 5 and 25 μM when exposed to tumor strains, similarly actives when compared to vemurafenib, a reference chemotherapeutic. When CC<sub>50</sub> of these compounds were evaluated in tumoral and non-tumoral cell lines, they did not show cytotoxicity to the non-tumor cell line, in which 80% of viable cells were detected. Regarding the action of the compounds on the activity of caspases, the data demonstrated that there was no increase in the activity of any of the caspases, assuming that cell death was independent of caspases. According to the results of a specific set of tests the cytotoxic and antiproliferative effects occur by the induction of oxidative stress was suggested. In addition, the compounds exhibited anti-metastatic activity, inhibiting cell proliferation and invasion, as well as blocking angiogenesis. The mononuclear H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga complex on SK-MEL 28 tumor line showed a reduction of VEGF gene expression by approximately 20% compared to control. In conclusion, the compounds tested not only showed significant cytotoxic activity but also demonstrated *in vitro/in vivo* anti-metastatic and antiangiogenic effects.

According to the data obtained, a new line in the exploration of biological activity as promising antitumor agents was evidenced.

**Keywords:** Mononuclear complex, melanoma, cytotoxicity, VEGF expression, antimetastatic activity, antiangiogenic activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da progressão do melanoma. ....	20
Figura 2 - Pontos de verificação (Checkpoints) envolvido na progressão do ciclo celular. ....	28
Figura 3 - A angiogênese como fonte de disseminação do câncer.....	30
Figura 4 - Complexos de gálio em fase de testes clínicos: a) tris(maltolato)gálio(III) e b) tris(8-quinolinolato)gálio(III). ....	32
Figura 5 - Ligante não simétrico H3LM3 .....	33
Figura 6 - Complexo de gálio H3LM3Ga .....	33
Figura 7 - Equação da síntese do ligante H3LM3. ....	36
Figura 8 - Equação da síntese do complexo mononuclear de H3LM3Ga .....	36
Figura 9 - Avaliação da citotoxicidade.....	45
Figura 10 - Citotoxicidade em linhagem celular HUVEC .....	48
Figura 11 - Determinação do tipo de morte celular induzida pelo H3LM3 e H3LM3 Ga em SK-MEL 28 em 24h. ....	50
Figura 12 - Determinação do tipo de morte celular induzida pelo H3LM3 e H3LM3 Ga em SK-MEL 147 em 24h. ....	51
Figura 13 - Efeito de H3LM3 e H3LM3Ga na invasão celular em SK-MEL 28 .....	53
Figura 14 - Efeito de H3LM3 e H3LM3Ga na invasão celular em SK-MEL 147. ....	54
Figura 15 - Efeito de H3LM3 e H3LM3 Ga na formação de colônia em células SK-MEL 28.....	55
Figura 16 - Efeito de H3LM3 e H3LM3 Ga na formação de colônia em células SK-MEL 147.....	56
Figura 17 - Atividade Antiangiogênica apresentada pelo ligante H3LM3. ....	57
Figura 18 - Atividade Antiangiogênica apresentada pelo complexo mononuclear de H3LM3Ga.....	58
Figura 19 - Conteúdo celular de EROs em células SK-MEL 28.....	59
Figura 20 - Conteúdo celular de EROs em células SK-MEL 147.....	60
Figura 21- Efeito do ligante não-simétrico H3LM3e do complexo mononuclear de H3LM3 Ga sobre as atividades das caspases 3, 8, 9, 12 após o tratamento de células SK-MEL 28.....	62

Figura 22 - Efeito do ligante não-simétrico H3LM3e do complexo mononuclear de H3LM3 Ga sobre as atividades das caspases 3, 8, 9, 12 após o tratamento de células SK-MEL 147.....	62
Figura 23 - Proteína VEGF em linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 28.....	64
Figura 24 – Proteína VEGF em linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 147.....	65
Figura 25 - Hipótese do mecanismo de ação antitumoral dos compostos pesquisados neste estudo.....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alguns parâmetros químicos comparativos dos íons Ga <sup>3+</sup> e Fe <sup>3+</sup> .....	32
Tabela 2 - Valores de CC50 (µM) em SK-MEL 28 .....	46
Tabela 3 - Valores de CC50 (µM) em SK-MEL 147 .....	47



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APAF-1	Fatorativador de proteases-1
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
B-RAF	Homólogo B do oncogene viral de sarcoma de murinov- <i>raf</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica 50%
DMEM	Dulbecco'smodifiedeagle (meio de cultivo celular)
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Hepes	Ácido 2-[4-(2-hidroietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
IP	Iodeto de propídio
KCl	Cloreto de potássio
MM	Melanoma metastático
MMP	Metaloproteinase
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
MAPK	Proteína cinaseativada por mitógeno
N-RAS	Homólogo do oncogene viral <i>RAS</i> do neuroblastoma (v-ras)
PBS	Tampão fosfato salino
Pten	Proteína fosfatase e homólogo de angiotensina
SFB	Soro fetal bovino



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 CÂNCER: ASPECTOS GERAIS.....	17
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
2.1. CÂNCER DE PELE .....	18
2.2 MELANOMA E NÃO MELANOMA .....	19
2.3 CITOTOXICIDADE .....	22
2.3.1. Apoptose .....	22
2.3.2 Autofagia.....	23
2.3.3 Necrose .....	24
2.3.4. Necroptose .....	25
2.3.5. Ferroptose.....	25
2.3.6. Senescência .....	26
2.3.7. Ciclo celular .....	26
2.3.8. Metástase e invasão.....	28
2.3.9. Metástase e angiogênese .....	29
2.3.10 Novas estratégias para o Tratamento do Câncer .....	30
2.3.10.1 Química Inorgânica Medicinal .....	30
2.3.10.2 Terapia do Câncer: Gálio .....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 REAGENTES E ANTICORPOS .....	35
4.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS .....	35
4.2.1 Síntese do ligante H3LM3 .....	35
4.2.2 Síntese do complexo mononuclear de H3LM3Ga .....	36
4.3 CULTURA DE CÉLULAS .....	37
4.4 TRATAMENTO CELULAR .....	37
4.5 VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO DE MTT .....	37
4.6 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (ENSAIO CLONOGÊNICO) .....	38
4.7 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR .....	39
4.8 ANÁLISE DO TIPO DE MORTE CELULAR.....	39

4.9 ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM) .....	40
4.10 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS).....	41
4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CASPASES 3, 8, 9 E 12 .....	41
4.12 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA VEGF POR IMUNOELETROFORESE.....	42
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO.....	44
<b>5.1.1 Avaliação da viabilidade celular.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.2 Avaliação do tipo de morte celular induzida.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1.3 Ensaio de Invasão Celular.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.4 Ensaio de Colônia (Ensaio Clonogênico) .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1.5 Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM) .....</b>	<b>57</b>
<b>5.1.6 Determinação da concentração intracelular de EROs ...</b>	<b>59</b>
<b>5.1.7 Avaliação da Atividade das caspases 3, 8, 9 e 12.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1.8 Avaliação da Proteína VEGF por imunoeleetroforese.....</b>	<b>63</b>
<b>6. RESUMO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER: ASPECTOS GERAIS

Dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam mais de 21 milhões de novos casos de câncer até 2030. Bem definido como um problema de saúde pública, o câncer é apontado como a maior causa de mortes no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (OMS, 2015).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) menciona para os anos de 2016/2017 600 mil novos casos de câncer no país, em relação à incidência destaca-se entre os homens o câncer de próstata (61 mil) e de pulmão (27 mil), entre as mulheres de mama (58 mil) e de colo de útero (33 mil), todos seguidos do câncer de pele do tipo não melanoma (INCA, 2016).

O entendimento do câncer mais frequente no Brasil é de extrema importância: quando comparado com os diversos tipos de câncer malignos no Brasil, o melanoma destaca-se por alcançar 25% dos casos (INCA, 2016).

A cascata de RAS, RAF, MEK e ERK está envolvida na via de sinalização das MAPK e é de fundamental importância e entendimento no mecanismo do melanoma. Estas proteínas são imprescindíveis no crescimento, proliferação e sobrevivência celular (WELLBROCK; HURLSTONE, 2010).

Os fármacos que apresentam como alvo específico proteínas derivadas de genes envolvidos na progressão tumoral e no controle do desenvolvimento, tem ganhado atenção nos últimos anos na pesquisa. Como exemplo menciona-se os inibidores de tirosina-cinase anti-EGFR (gefitinib e erlotinib) usados para o tratamento de câncer de pulmão; o imatinibe é um fármaco inibidor de ABL quinases, utilizado para o tratamento de tumores gastrointestinais (GISTs); trastuzumabe, pertuzumabe e lapatinibe são fármacos de terapias anti-HER2, utilizadas para o tratamento de câncer de mama; bem como os fármacos utilizados para o tratamento de melanomas como os agentes inibidores de BRAF vemurafenibe e dabrafenibe, e o agente inibidor de MEK trametinib (DUFFY, 2013).

São utilizadas diferentes formas para o tratamento do câncer como: a excisão cirúrgica, a radioterapia e a quimioterapia, associadas ou não. A quimioterapia ainda é a mais utilizada por permitir o tratamento do início da doença até os casos mais graves, já na presença de metástases (AJITH; JANARDHANAN, 2003). Diversos fatores são

levados em conta quando se define o tipo de tratamento para cada indivíduo.

Dessa forma, o tratamento do câncer vem sendo tema de pesquisas de novos compostos bioativos, que sejam capazes de substituir os fármacos disponíveis, com vantagens relacionadas à eficácia, a toxicidade, a segurança e qualidade de vida dos pacientes (HANNON, 2007).

Para obter fármacos com estas propriedades a estratégia tem sido planejar moléculas mais seletivas, que exerçam a função citotóxica unicamente na célula cancerígena, sem afetar os demais tecidos. Neste contexto, os complexos metálicos representam uma alternativa, uma vez que, possuem uma série de propriedades químicas e bioquímicas que podem ser moldadas de acordo com o objetivo desejado. Entre estas propriedades destacam-se, o estado de oxidação do metal, o raio iônico e o tipo de molécula quelante. Complexos contendo Ga(III) que atuam como agentes anti-neoplásicos têm apresentado resultados promissores (TIMERBAEV, 2009).

O íon Ga(III) não possui uma função fisiológica reconhecida no corpo humano, no entanto apresenta características que permite a interação com certos processos celulares e proteínas específicas, como a transferrina e a ferritina (TIMERBAEV, 2009; HARRIS; MESSORI, 2002).

Neste sentido, este estudo visa caracterizar a atividade antitumoral e antiangiogênica do complexo metálico mononuclear de Ga(III) com ligante não-simétrico.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. CÂNCER DE PELE**

O Câncer de pele consiste em uma neoplasia maligna dos melanócitos, em que alterações são encontradas na forma de lesões precursoras. Inicia-se na camada basal da epiderme, e progride para a fase de crescimento no sentido radial ou vertical na pele. Quando ocorre a invasão horizontal do melanoma na epiderme, é caracterizado como crescimento radial. Este fato pode levar ou não a um crescimento até a derme papilar superior. Na fase de crescimento vertical, a formação de nódulos visíveis e palpáveis pode ocorrer, com o rompimento da membrana basal devido ao crescimento acelerado através da densidade da pele (LÖFFEK et al., 2006).

Neste processo de progressão do melanoma, ocorre a transformação e migração dos melanócitos até a derme que é o principal local de propagação desta doença. (LABROUSSE et al., 2004). Algumas características estão diretamente correlacionadas com o potencial metastático das células, como: idade, sexo, sítio anatômico e espessura do tumor (BALCH et al., 2009; EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014).

## 2.2 MELANOMA E NÃO MELANOMA

O câncer de pele ocorre quando as células dividem-se e apresentam um crescimento de forma desordenada. Dergham et al. (2004) descreve que células que se alinham em camadas, e de acordo com a camada afetada, denomina-se os diferentes tipos de câncer (SOUZA, R.J.S; CORREA, M.P; REZENDE, M.L., 2011). Estes dividem-se em câncer de pele do tipo não-melanoma e o do tipo melanoma cutâneo.

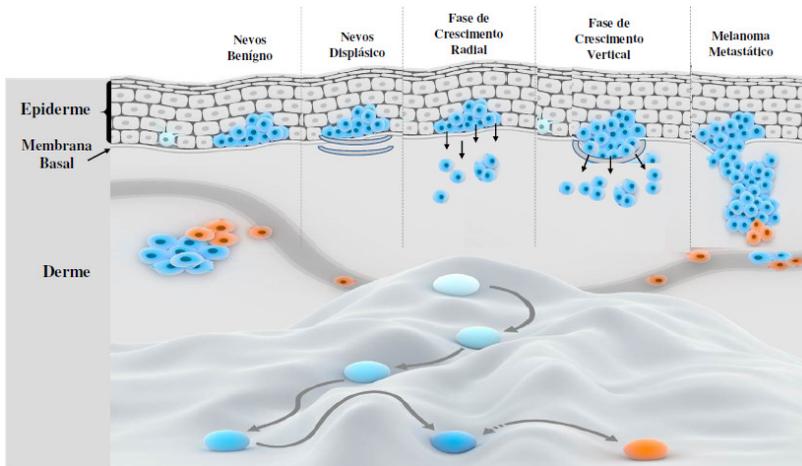
Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015) revelam que 3.000 novos casos de câncer de pele ocorreram e ocorrerão nos anos de 2016-2017. O número de casos de melanoma cutâneo e taxas de mortalidade vêm crescendo nos países nos quais os casos são registrados. Os casos diagnosticados chegam a 160.000 em base mundial (VIEIRA, 2013; IRANZO; RUBIA-ORTI; CASTILLO; 2015).

O melanoma cutâneo é um tumor maligno proveniente da transformação genética dos melanócitos, que estão localizados na camada basal da epiderme, cuja função é sintetizar e transferir o pigmento melanina para os queratinócitos circundantes, protegendo assim estas células de lesões ocasionadas por raios UV (PEJKOVA; DZOKIC; PANOVA; 2016). Este tipo de tumor é encontrado em diferentes regiões anatômicas: pele, olho, revestimento nasal, orofaringe, anus, vagina e trato urinário (FERREIRA; NASCIMENTO; 2016).

A progressão tumoral consiste no desenvolvimento de uma determinada neoplasia passando por diferentes fases, no caso do melanoma, passando por transformações até chegar a metastatizar outros tecidos ou órgãos (VIEIRA, 2013). WALLACE H. CLARK definiu em 1984 um modelo de progressão dos tumores melanocíticos em 5 estágios: estágio 0, melanócitos normais; estágio 1 nevos congênitos e adquirido na presença de melanócitos estruturalmente normais; estágio 2 nevos displásicos com arquitetura atípica; estágio 3 melanoma *in situ*

(MIS), também conhecido como fase do crescimento radial, isto é melanoma sem forma metastática; estágio 4 fase de crescimento vertical, melanoma primário com metástase; estágio 5 melanoma metastático (PEJKOVA; DZOKIC; PANOV; 2016). Frequentemente o melanoma origina-se nos nevos e evolui diretamente à fase metastática, sem necessariamente passar por todas as fases. Na figura 1 estão representadas as fases de progressão do melanoma na figura abaixo (ZAIDI; DAY; MERLINO; 2008).

Figura 1- Esquema representativo da progressão do melanoma.



As células cancerosas proliferativas representadas em azul; as células resistentes aos fármacos representadas em laranja.

Fonte: Adaptado de VERFAILLIE et al (2015).

O melanoma cutâneo é descrito na literatura como uma doença poligênica multifatorial (FRANZON; LORO; PANDOLFO; 2015), ou seja, vários fatores externos ambientais e até comportamentais podem auxiliar no desencadeamento da doença, além da predisposição genética em indivíduos da mesma família (VIEIRA, 2013). Estes fatores corroboram o fator de a herança genética aumentar a chance de desenvolvimento da doença. Contudo, pouco frequentes na população geral são as mutações de alta penetrância, mas que podem conferir em um risco mais elevado, como no caso dos melanomas familiares em que os genes CDK4 e CEKN2A são passíveis de sofrerem mutações (VIEIRA, 2013; WANGARI-TALBOT; CHEN, 2013).

Mutações são alterações irreversíveis na molécula de DNA, podendo ser silenciosas ou apresentar efeito fenotípico. Na

carcinogênese as mutações têm papel determinante, ativando oncogenes ou inativando genes supressores tumorais (VIEIRA, 2013). No caso específico para o melanoma, mutações mais frequentes são verificadas em três principais vias metabólicas: via das cinases ativada por mitógenos (MAPK), via da PI3K/AKT e via da p16INK4A. As mutações ocorrem em genes que codificam proteínas funcionalmente relevantes em pelo menos uma destas três vias metabólicas, ocasionando invariavelmente um tipo de neoplasia cutânea (WANGARI-TALBOT; CHEN, 2013).

A via clássica MAPK que envolve RAS-RAF-MEK e ERK tem papel fundamental na evolução do melanoma como é comprovado em diversos estudos focados neste tipo de câncer (PEJKOVA; DZOKIC; PANOV; 2016; LIU; FUKUNAGA-KALABIS; LI et al., 2014). Uma mutação no gene BRAF irá desenvolver uma ativação constitutiva de cinases na via RAS-RAF-MEK-ERK, promovendo uma proliferação celular tumoral descontrolada (DAVIES et al., 2002).

Uma pele sem proteção de radiação UV está propícia a danos, que podem levar a efeitos irreparáveis, provocando efeito carcinogênico, por envolver alterações químicas na molécula de DNA formando dímeros de pirimidina (BALOGH; PEDRIALI; BABY; VELASCO, 2011; WANGARI-TALBOT; CHEN, 2013). Desta forma, pessoas com pele clara estão mais propensas a desenvolver algum tipo de melanoma, pois não há grande proteção biológica no tecido cutâneo proveniente da melanina. Dados da literatura apontam que as partes mais atingidas por melanoma cutâneo são os ombros e pernas, além de constatar uma relação com as regiões geográficas que apresentam maior intensidade de luz solar, também apresentam maior número de casos de melanoma (FRANZON; LORO; PANDOLFO, 2015).

Os números de nevos são relativos quando se refere ao surgimento de melanoma, este fato se explica quando se observa uma passagem brusca de crescimento (tamanho) de um nevo melanocítico para um melanoma cutâneo, normalmente ocorre em indivíduos com idade de aproximadamente vinte anos. A literatura descreve que mais de 20% dos melanomas desenvolvem-se devido um ou mais nevos atípicos, displásicos (TUONG; CHENG; ARMSTRONG, 2012).

O tratamento convencional primário para o melanoma cutâneo é cirúrgico, em que a lesão será removida e analisada quanto ao estágio e localização (FOLETTTO; HAAS, 2014). Terapias sistêmicas adjuvantes tem demonstrado sucesso em estágios avançado de melanoma cutâneo, como é o caso do Interferon- $\alpha$  que proporcionou aumento da sobrevivência em 5% dos pacientes com melanoma cutâneo; e a

Interleucina-2 que promoveu remissão em 6% dos casos de melanoma metastático, ambas as terapias foram aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (TUONG; CHENG; ARMSTRONG, 2012). Em 2011 o FDA aprovou o uso Ipilimumab para o tratamento de melanoma em estágio avançado, este medicamento é capaz de induzir uma resposta mediada por células T contra o tumor (TUONG; CHENG; ARMSTRONG, 2012; FOLETTO; HAAS, 2014). O fármaco Pembrolizumabe (anti-PD1) baseado em anticorpos monoclonais, foi aprovado pelo FDA em 2015, veio com a proposta de ser utilizado nos casos mais avançados de melanoma metastático. Age contra um receptor da célula responsável, que por conta do câncer, atua desativando o sistema imunológico que deveria combater a doença. Quando o medicamento atua, devolve ao organismo a capacidade de ativação imunológica contra o melanoma (BARONE et al., 2017). Novas terapias farmacológicas tendo como alvos receptores biológicos estão atualmente em desenvolvimento, como é o caso do Bevacizumab e o Sorafenib.

## 2.3 CITOTOXICIDADE

As condições de uma célula são auto monitoradas constantemente, incluindo a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, o balanço do ciclo das vias de regulação celular e integridade do genoma. Caso haja neste processo algum dano ou funcionamento inadequado, sistematicamente o *backup* é ativado e através deste processo é definido se a célula continua ou não o seu ciclo natural. Ocorrendo um grave dano, as vias de morte são ativadas e em caso do sistema interno das células sofrer um desequilíbrio, a proliferação descontrolada seria iniciada. O resultado destes eventos culminaria no surgimento do câncer (HEJMADI, 2010).

Através do relatório elaborado pelo Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (em inglês, *Nomenclature Committee on Cell Death* 2012) hoje podemos definir o tipo de morte celular pelas características moleculares e não mais pela morfologia. (GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2011).

Alguns tipos de morte celular mais comumente encontrados serão relatados a seguir.

### 2.3.1. Apoptose

Bem definida e descrita como o tipo de morte celular programada, a apoptose é fundamental na homeostase tecidual.

(DASGUPTA; NOMURA; SHUCK; YUSTEIN, 2016). Entre as características bioquímicas e morfológicas da apoptose estão a condensação da cromatina e a fragmentação de DNA resultando em formação de corpos apoptóticos (SUNG; CHUNG; KIM, 2016).

Diversas doenças como os cânceres e as doenças neurodegenerativas, além de fenômenos como respostas inflamatórias e danos celulares causados por agentes genotóxicos envolvem a apoptose que tem um papel relevante na homeostase (DASGUPTA; NOMURA; SHUCK; YUSTEIN, 2016).

Existem duas vias de fundamental importância que são responsáveis pelo desencadeamento da apoptose. Denominadas como via intrínseca ou mitocondrial, que recebe um gatilho quando sobre estresse oxidativo, danos genéticos entre outros fatores (FIANDALO; KYPRIANOU, 2012). Essa via pode ser desencadeada também independentemente de ativação de caspases. A via extrínseca também conhecida como citoplasmática, pode ser ativada por vários sinais celulares (CAO et al., 2016).

Outro mecanismo bastante citado na via extrínseca quando se refere a apoptose estão relacionados com os receptores de morte, os quais são ativados por meio da interação receptor-ligante. Os mais conhecidos são da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) (FAUBION; GORES, 1999).

Estas vias atuam de forma distintas, receptores ligados aos ligantes, induzem eventos em cadeia formando complexos com a pró-enzima 8, ativando caspase 8 que ativa caspase 3 (efetora). A caspase 8 cliva a proteína Bid que com seus fragmentos pode permeabilizar a mitocôndria e acarretar na morte celular (COTTER, 2009; FAVALORO et al., 2012).

Os oncogenes estão presentes na regulação da morte celular, os exemplos são Myc a p53 (proteína de supressão tumoral), em que Myc pode enfraquecer as células e ativar a morte celular por apoptose e p53 codifica uma fosfoproteína que tem como objetivo a tumorigênese (STELLER, 1995; EISCHEN et al., 2001; MACLEAN et al., 2003). Terapias de câncer podem ser dirigidas a ação e regulação de Myc sob um mecanismo mais detalhado de apoptose.

### **2.3.2 Autofagia**

Descrita de três formas diferentes: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (CMA), a autofagia consiste em um dos tipos de morte celular que ocorre devido a

vacuolização citoplasmática que aumenta o fluxo autofágico. Definida também por indicar a sobrevivência ou a morte celular (HEJMADI, 2010). Em proteínas CMA malformadas são translocadas por chaperonas citosólicas e lisossomais com o auxílio do transportador LAMP- 2 para os lisossomas. Uma vez nos lisossomas, as proteínas malformadas são degradadas pela ação de hidrolases lisossômicas (TSUCHIHARA; FUJII; ESUMI, 2009). Macroautofagia ocorre em 90% dos casos de autofagia celular, sendo o tipo mais complexo, com mais de 30 genes e proteínas envolvidos neste processo (ZHOU et al., 2012). O processo é iniciado com o desenvolvimento de uma estrutura com membrana dupla, chamada de fagóforo, que engloba frações do citoplasma, de forma seletiva ou não, através da atividade de proteínas.

### 2.3.3 Necrose

Embora a necrose tenha sido identificada inicialmente como um programa de morte celular reserva e/ou de apoio quando a apoptose é bloqueada, é agora reconhecido como um mecanismo de defesa celular contra infecções microbianas e virais. Estudos recentes indicam que formas de necrose podem envolver diretamente as vias de sinalização, ativando caspases e RIP (Proteínas Inativadoras de Ribossomos - *Ribosome-inactivating proteins*) induzindo dois diferentes processos: apoptose ou necrose programada (VANLANGENAKKER; VANDEN BERGHE; VANDENABEELE, 2012).

O processo de necrose celular é caracterizado por inchaço citoplasmático e mitocondrial, seguido de ruptura da membrana plasmática e consequentemente liberação de conteúdo tóxico para o espaço extracelular, levando à geração de uma resposta inflamatória, que pode causar danos graves as células vizinhas (ANAZETTI; MELO, 2007; HENRIQUEZ et al., 2008).

Doenças recorrentes da atual sociedade estão relacionadas à necrose, como cirrose hepática, doenças neoplásicas, diabetes, entre outras (HENRY, 1999; MCCALL, 2010).

Diferentes formas de morte celular necrótica podem ser distinguidas com base nos respectivos mecanismos de iniciação. Grande parte do conhecimento baseia-se no estudo da necroptose induzida pelo TNF (Fator de Necrose Tumoral – *Tumor Necrose Factor*)

(VANLANGENAKKER; VANDEN BERGHE; VANDENABEELE, 2012). A necrose dependente das atividades do receptor de quinase que interage com a proteína quinase 1 (RIPK1) e RIPK3 foi definida como necroptose (VANLANGENAKKER;

VANDEN BERGHE; VANDENABEELE, 2012; GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2011; HOLLER; ZARU; MICHEAU et al. 2000; ZHANG; SHAO; LIN et al. 2009).

#### **2.3.4. Necroptose**

Os tecidos são mantidos pela homeostase que é monitorada por um processo fisiológico denominado de morte celular (LOCKSHIN; ZAKERI, 2007). A visão convencional refere-se à forma de morte celular programada como apoptose, enquanto a necrose é considerada como uma morte celular acidental e indesejável (DUNAI et al., 2011).

A necroptose foi definida em 2005 por JUN-YING, que relatou necroptose como um tipo novo de morte celular programada, cujas características eram semelhantes a necrose e apoptose, como: lise citoplasmática, condensação da cromatina e ruptura da membrana celular (VANDENABEELE; GALLUZZI; VANDEN-BERGHE et al., 2010). A necroptose contribui para uma vasta gama de eventos celulares patológicos incluindo lesão cerebral isquêmica, doenças neurodegenerativas e infecções virais (DUNAI et al., 2011).

Em paralelo às pesquisas bem definidas sobre necroptose surgiram evidências de que este fenômeno está envolvido na regulação de uma variedade de processos fisiológicos. As vias moleculares de necroptose tem sido muito estudada, entre elas a indução pelo receptor de fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) (CHEN; HWANG; CHOU et al., 2003). Vale ressaltar que espécies reativas de oxigênio (EROS) um tipo de estímulo de estresse físico-químico podem culminar em necroptose, entre outros tipos de estímulos inclui-se: agentes antitumorais, em particular aqueles que provocam danos no DNA, radiação, terapia fotodinâmica entre outros (CHO; CHALLA; MOQUIN et al., 2009; ZHANG; ZHOU; MCQUADE et al., 2011; VANDEN-BERGHE; VANLANGENAKKER; PARTHOENS et al., 2011).

#### **2.3.5. Ferroptose**

É essencial para processos fisiológicos fundamentais como desenvolvimento, imunidade e homeostase dos tecidos. Os cânceres humanos estão frequentemente relacionados a defeitos na capacidade de iniciar ou executar morte celular, tornando-os resistentes a agentes quimioterapêuticos atualmente disponíveis que se destinam à apoptose (LINKERMANN et al., 2014; GALLUZZI et al., 2015). A existência deste tipo de morte celular foi descoberta em 2012 pelo pesquisador BRENT R STOCKWELL, usando uma abordagem farmacológica;

consiste um processo de morte celular regulado, não-apoptótico, por peroxidação dependente de alta concentração de íons ferro (LINKERMANN et al., 2014).

A ferroptose é uma morte celular que pode ser desencadeada por pequenas moléculas ou condições que inibem a biossíntese de glutatona, causando o acúmulo de substâncias tóxicas, incluindo espécies reativas de oxigênio (EROS) (DIXON; LEMBERG; LAMPRECHT, 2012; YANG; SRIRAMARATNAM; WELSCH, 2014). Ferroptose consiste em reações de oxidação dependente de Ferro e muito diferente do processo de apoptose, necrose, autofagia. Em células tumorais a ferroptose pode estar relacionada com a proteína p53 e na mutação da via RAS-RAF-MEK, quando presente. (DIXON; LEMBERG; LAMPRECHT, 2012; DOLMA et al., 2007). Enquanto a apoptose é desencadeada por situações letais como: dano ao DNA, a ferroptose é envolvida por inativação de processos metabólicos induzindo um colapso celular. Autores definem a apoptose como “suicídio celular”, a ferroptose por sua vez é definida como uma “sabotagem celular” (GREEN; VICTO, 2012).

### **2.3.6. Senescência**

A senescência consiste em um processo metabólico natural celular, em que mesmo em ótimas condições de crescimento, as células perdem a função de proliferação. E esta incapacitação é irreversível mesmo que o processo seja ativado por mitógenos. Processo reconhecido como envelhecimento celular, que através de uma organização genética, promove a parada do ciclo em G1, fase de crescimento celular. Células em senescência carregam características marcantes como: aspecto achatado, inchaço, multinucleação e citoplasma com granularidade (NISHIO et al., 2001).

Por outro lado, pesquisas sugerem que células que poderiam tornar-se cancerígenas, devido ao crescimento desordenado, são impedidas pelo mecanismo endógeno de senescência celular. Neste sentido, a ativação do mecanismo senescente seria primordial para controle do ciclo celular (CAMPISI; D'ADDA DI FAGAGNA, 2007).

### **2.3.7. Ciclo celular**

O mecanismo de divisão celular é um evento, tradicionalmente, dividido em crescimento, replicação genômica e divisão: síntese do DNA (fase S), mitose (fase M), G1 e G2 (fases de crescimento); Estas fases são geridas por uma maquinaria bioquímica que controla e também

está ligada ao crescimento e proliferação celular (DIAZ-MORALLI et al., 2013).

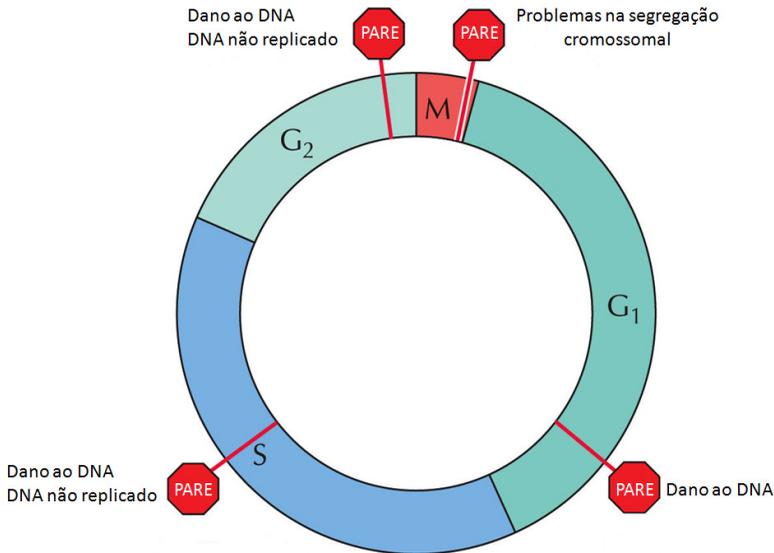
Na fase G0 as células encontram-se em estado de inércia, não se dividem e a atividade nuclear está elevada. A próxima fase consiste na G1, na qual ocorre divisão e formação de uma nova célula. Nesta fase, ocorre também a estimulação para produção de constituintes fundamentais para nova célula. Na fase S ocorre a síntese de DNA, caracterizada por ser uma etapa crucial no ciclo celular. Já na fase G2 ocorrerá a síntese de componentes celulares além do processo de mitose, finalizando o ciclo celular. Posteriormente, as células entram novamente na fase G0 (ALMEIDA et al., 2005; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

A progressão do ciclo celular é checada por proteínas como as ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDK). As mesmas checam a progressão do ciclo e permanecem com as células em divisão, culminando em apoptose. Caso houver falha de uma ciclina ou ocorrer uma mutação em alguma proteína, pode ocorrer o aparecimento de tumores (DIAZ-MORALLI et al., 2013; MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Os pontos exatos de verificação ou checagem entre as fases são chamados de *checkpoints*, os quais são responsáveis pelo controle do ciclo celular, bem como pela prevenção para que não ocorram erros genéticos (Figura 2).

Os pontos de checagem são responsáveis pela indução da parada do ciclo celular, isto é, ajudam a reparar o DNA, mantendo o ciclo estagnado até que o reparo seja realizado, para em seguida reiniciar o ciclo (BARTKOVA et al., 2006).

Figura 2 - Pontos de verificação (Checkpoints) envolvido na progressão do ciclo celular.



Na fase G<sub>1</sub>: ocorre avaliação do DNA. Na fase S e G<sub>2</sub>: verificação de integridade do DNA e fidelidade da replicação. Na fase M: avaliação da integridade do DNA, o que garante a correta segregação dos cromossomos e a estabilidade genética.

Fonte: Adaptado de ALBERTS et al, 2004.

### 2.3.8. Metástase e invasão

Metástases consistem no fenômeno caracterizado por células que invadem tecidos e até mesmo os órgãos, devido ao crescimento celular desordenado (maligno) (INCA, 2016).

O processo de angiogênese é fundamental para o crescimento de um tumor primário, em função de necessidades metabólicas extremas é necessário um suprimento sanguíneo intenso, conseqüentemente ocorre a sinalização para a formação de novos vasos sanguíneos. Adicionalmente, os novos vasos sanguíneos exercem uma função extra, favorecendo a entrada das células tumorais na corrente sanguínea, esse acontecimento é chamado de intravasamento. Essas células que

entraram na corrente sanguínea podem chegar aos linfonodos e multiplicarem-se (BABA; CÂTOI, 2007; CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002). As células presentes na circulação usam essa capacidade para alojarem-se em um novo ambiente, ocorrendo assim o extravasamento, que vai da circulação até o tecido e órgão. Presentes em outro ambiente, as células dão início ao novo crescimento tumoral, dando origem à micro metástases pré-angiogênicas, cujo crescimento está ligado a angiogênese para a formação de um novo tumor (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002).

O processo angiogênico e de invasibilidade estão interligados através do desenvolvimento de metástases (FRIEDL et al., 2012).

As alterações no transporte de oxigênio, sendo fundamentalmente exercidos pelos numerosos novos vasos são fundamentais para o crescimento de tumores e estão diretamente relacionadas ao equilíbrio de fatores antiangiogênicos e angiogênicos. A proteína de sinalização identificada como fator de crescimento endotelial vascular VEGF (em inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), atribuído a várias funções e múltiplas formas é responsável pela proliferação, migração e principalmente pela formação de novos vasos (STEEG; THEODORESCU, 2008).

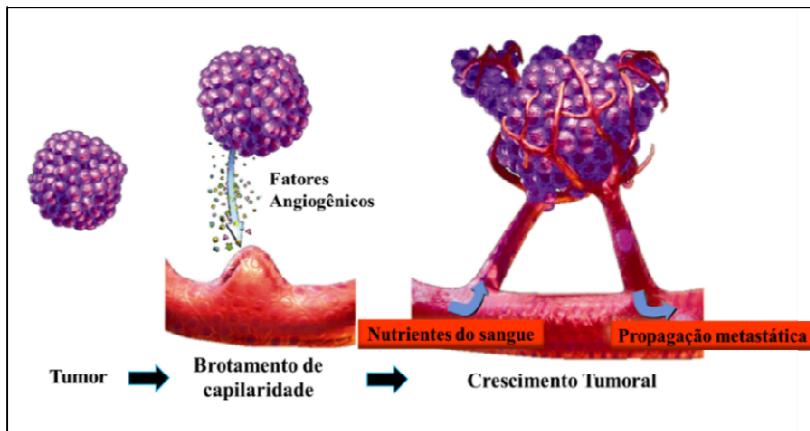
### **2.3.9. Metástase e angiogênese**

A Angiogênese é definida como a formação de nova vascularização oriunda de pequenos capilares sanguíneos e vênulas pós-capilares já existentes. A etapa angiogênica é fundamental no processo metastático (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). O processo metastático pode ocorrer através de via hematogênica, linfática ou pela penetração de células nas cavidades corpóreas ou no espaço circundante dos órgãos (FIDLER, 2002).

A nutrição e a passagem de oxigênio são fundamentais para o crescimento tumoral, por esse motivo a angiogênese exerce uma relação importante com o processo metastático, que atua através do deslocamento de células tumorais malignas, partindo de um sítio primário visando atingir locais secundários (Figura 3).

A angiogênese tumoral é mediada pela secreção de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), provindos das células tumorais e células do estroma que dão suporte à estrutura o tumor (CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2000; WEIS; CHERESH, 2011).

Figura 3 - A angiogênese como fonte de disseminação do câncer



Fonte: Adaptado de SIEMANN et al., 2002.

## 2.3.10 Novas estratégias para o Tratamento do Câncer

### 2.3.10.1 Química Inorgânica Medicinal

Os íons metálicos são essenciais para funções vitais em organismos vivos. Assim os complexos metálicos vêm adquirindo importância na pesquisa de novos fármacos para o tratamento de várias doenças. Não só os metais essenciais para vida, como zinco, cobre e manganês, mas também muitos metais anteriormente considerados prejudiciais, tais como o selênio, o molibdênio e o rutênio (BERALDO, 2005).

### 2.3.10.2 Terapia do Câncer: Gálio

O interesse por moléculas com ação sobre diversas doenças tem sido o principal foco nos estudos que envolvem a bioinorgânica. Visto que esses metais também podem atuar como radiofármacos, auxiliando para contribuir no diagnóstico de uma ampla classe de doenças (LIPPARD; BERG, 1994; THOMPSON; ORVIG, 2006). Da mesma forma que resultados promissores vêm sendo apresentados com os potenciais metalofármacos. Entre os metalofármacos, destaca-se os complexos metálicos de gálio (JAKUPEK; GALANSKI; ARION, 2008). Neste sentido, a busca pelo desenvolvimento e entendimento do mecanismo de ação destes metais biologicamente ativos tem sido explorada.

O estudo dos metais vem ocorrendo há mais de 3500 anos, iniciados com a platina (1960), e posteriormente o gálio. Naquela época os metais eram recomendados a saúde e hoje pesquisas recentes certificam os relatos (GUNN, 2014).

O gálio destaca-se na área de diagnóstico clínico, aplicado como agente para de imagem, na área de medicina nuclear (ANDERSON; WELCH, 1999). Com o surgimento e aplicação de medicamentos que envolviam os complexos metálicos, deu-se origem a Química Inorgânica Medicinal, que é aplicada em técnicas de diagnóstico e processos terapêuticos. Com a descoberta da atividade antitumoral do complexo de cis-diaminodicloroplatina (II) ou mais conhecida como cisplatina, um enorme salto foi dado nos estudos e desenvolvimento de complexos que pudessem atuar como fármacos antitumorais (ROSENBERG et al., 1969; ROSENBERG, 1971).

O metal gálio começou a ser utilizado no tratamento do câncer por apresentar inúmeras características importantes para esse fim, como: diminuição da reabsorção óssea acelerada, redução de níveis plasmáticos e inibição da proliferação neoplásica (BANDOLI; DOLMELLA; TISATO, 2009). Por outro lado, foi observado que os sais trivalentes de  $Ga^{3+}$  são insuficientemente absorvidos pelo intestino, e alguns derivados são susceptíveis à hidrólise, fazendo com que sua eficiência biológica decaia (SILVA, 2008). Para tanto, visando a correção dessas deficiências, que se fez surgir interesse na síntese de compostos coordenados ao íon metálico, chamados de ligantes não-simétricos (SIMÕES et al., 2013).

Na Tabela 1 apresenta-se algumas características que proporcionam o melhor entendimento quando se relaciona o mecanismo do Gálio e do Ferro. A relação de afinidade que o gálio apresenta pela ferritina, é atribuída ao estado de valência do gálio ser a mesma do ferro no caso  $3+$ . O mecanismo do gálio é definido como um mecanismo de competitividade entre o gálio e o ferro tendo como resultado a ligação com a transferrina. No caso do câncer as células tumorais destacam-se pelo elevado teor em transferrina, quem acaba ganhando a concorrência é o gálio, pois o ferro pode ser reduzido para  $Fe^{2+}$  desligando facilmente da proteína e o gálio não. Adicionalmente, o gálio concentra-se nos endossomos dificultando a saída do ferro, no momento em que o  $Ga^{3+}$  é captado pelas células tumorais, ele substitui o  $Fe^{3+}$  no sítio da enzima RNA redutase, enzima que estimula a replicação de DNA, consequentemente como o cofator ligado não é o correto, ocorre a parada do ciclo celular e apoptose (CHUA et al., 2006; HANNON, 2007; MICHAEL; JAKUPEC; BERNHARD; KEPPLER, 2004).

Pesquisas recentes referente ao potencial de complexos oriundos de Ga(III) que apresentavam atividade antitumoral. Bem como, a utilização de composto de gálio na forma de GaNO<sub>3</sub> apresenta elevada toxicidade renal e hidrólise em meio fisiológico, levando à formação de hidróxidos de gálio insolúveis. Contudo a biodisponibilidade do gálio foi testada com a utilização de ligantes orgânicos (quelantes) para estabilizar o composto de gálio contra a hidrólise e facilitar a permeabilidade da membrana, obtendo-se resultados relevantes(GAMBINO et al., 2011;HANNON, 2007).

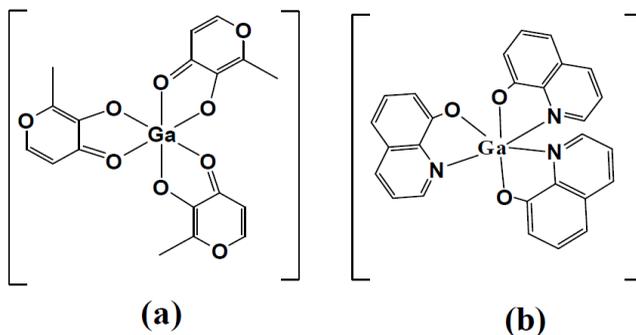
Conseqüentemente, investigações a respeito da atividade deste metal vêm crescendo e vários complexos de gálio estão em estudo como o tris(maltolato)gálio(III) (Figura 4.a) e o tris(8-quinolinolato)gálio(III) (Figura 4.b), os quais atualmente encontram-se em fase de estudos clínicos. Em testes antitumorais (Fase I) o tris(maltolato)gálio(III) foi muito bem tolerado, administrado em doses repetidas e elevadas, não apresentou toxicidade (HUMMER et al., 2012).

Tabela 1- Alguns parâmetros químicos comparativos dos íons Ga<sup>3+</sup> e Fe<sup>3+</sup>

Parâmetros	Ga <sup>3+</sup>	Fe <sup>3+</sup>
Raio iônico	0,62	0,64
Energia de ionização	30,71	30,65
Eletronegatividade	1,81	1,83

Fonte: Elaboração Própria

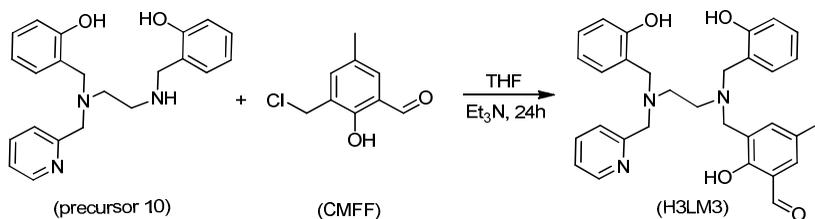
Figura 4 - Complexos de gálio em fase de testes clínicos: a) tris(maltolato)gálio(III) e b) tris(8-quinolinolato)gálio(III).



Fonte: (a) VERANIO, 2012; (b) HUMMER et al., 2012

Nas Figuras 5 e 6 é demonstrada a síntese dos dois compostos estudados nesse trabalho.

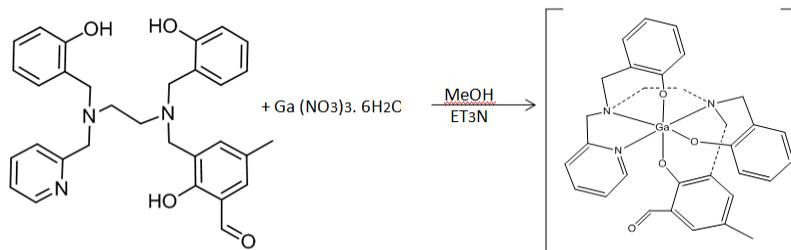
Figura 5 - Ligante não simétrico H3LM3



O composto H3LM3 consiste no ligante não simétrico, utilizado nos ensaios para fins de comparação como precursor do complexo de gálio.

Fonte: FONSECA, 2014

Figura 6 - Complexo de gálio H3LM3Ga



Fonte: FONSECA, 2014

Mediante o potencial antitumoral apresentado pelo complexo de gálio, ressalta-se o uso de abordagens terapêuticas diversas para explorar melhor tanto do ponto de vista do mecanismo de ação, quanto da proposição de novas terapias para o tratamento do câncer. Neste contexto, a proposta do presente estudo é elucidar, através de ferramentas farmacológicas e bioquímicas, o potencial antiproliferativo e antitumoral do novo complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga e eventual ação antitumoral do ligante *per se*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, a potencial atividade antitumoral do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga, bem como a proposição de mecanismos de ação associados a esta atividade.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar a faixa de concentração citotóxica de nitrato de gálio ( $GaNO_3$ ), do ligante não-simétrico e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga sobre linhagens celulares SK-MEL 28, SK-MEL 147 e HUVEC;
- ❖ Investigar o mecanismo de ação citotóxica *in vitro* do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga por meio das alterações do ciclo celular e da avaliação do tipo de morte celular induzido nas linhagens celulares tumorais.
- ❖ Avaliar o potencial antiproliferativo do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga sobre a linhagem tumoral SK-MEL 28 e SK-MEL 147 através do ensaio clonogênico.
- ❖ Avaliar o potencial antiproliferativo e possível inibição da migração celular promovidos pelo ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e pelo complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga sobre a linhagem tumoral SK-MEL 28 e SK-MEL 147.
- ❖ Analisar o efeito dos tratamentos do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga na invasão das linhagens tumorais.
- ❖ Avaliar *in vivo* o potencial antiangiogênico do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga sobre a membrana corioalantóica de embriões de galinha.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES E ANTICORPOS

Entre os meios para cultivo das células foram utilizados DMEN e RPMI, adicionados aos meios de cultura foram adicionados estreptomicina, penicilina e o soro fetal bovino, os quais que foram adquiridos da empresa Gibco (Grand Island, NY, EUA); A tripsina para utilização em cultura celular foi adquirida da empresa Cultilab; Para diferentes experimentos foram utilizados carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), cloreto de potássio (KCl), o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), e o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) adquiridos da empresa Reagen (Rio de Janeiro, Brasil). O álcool isopropílico, metanol e o clorofórmio foram adquiridos da Merck (Alemanha). O álcool etílico e o dimetil sulfoxido (DMSO) da empresa Nuclear; O Kit de anexina-V-FITC foi adquirida da BD (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) para utilização nos ensaios de citometria de fluxo; Os ensaios de citotoxicidade utilizou-se o sal de dimetiazoldifeniltetrazólio (MTT) fornecidos pela Invitrogen (Alemanha), junto ao azul de trypan, RNase, albumina bovina (BSA) e o triton; Da empresa Corning obteve-se o matrigelmatrix que foi utilizado para os testes de invasão celular; Através da Selleck Chemicals foi fornecido Vemurafenibe (PLX4032) fármaco de referência utilizado para o tratamento do melanoma, que foi utilizado como controle positivo para ensaios de citotoxicidade e da Sigma, St. Louis, MO a metilcelulose para o testes de angiogênese e o iodeto de propídio (IP) utilizado para os experimentos de citometria de fluxo.

### 4.2 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

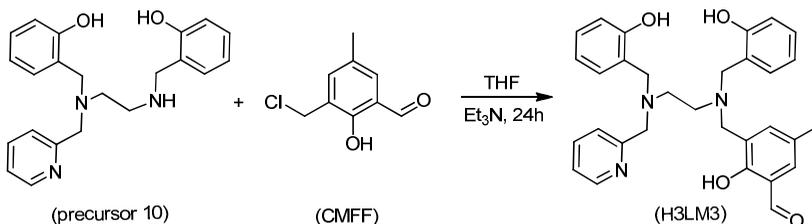
O complexo mononuclear de  $[\text{GaH}_3\text{LM}_3]$ , ligante não-simétrico  $\text{H}_3\text{LM}_3$  e o nitrato de gálio (Ga (III)) foram sintetizados no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC), do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) coordenado pelo Professor Adailton João Bortoluzzi.

#### 4.2.1 Síntese do ligante H3LM3

A preparação do ligante H3LM3 se deu por meio de THF (Tetrahidrofurano) (20 mL) que foi dissolvido no precursor chamado 10 (2g). Em seguida foi adicionado  $\text{Et}_3\text{N}$  (Trietilamina) (0,79 mL). Esta

solução foi acondicionada em temperatura de 0°C. Seguiu-se vertendo lentamente sobre a solução do composto. Após retirado todo solvente do produto de 24h, o mesmo foi dissolvido em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, em que a fase orgânica foi lavada três vezes com solução aquosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> e filtrada em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Uma vez realizada a retirada do solvente,

Figura 7 - Equação da síntese do ligante H3LM3.



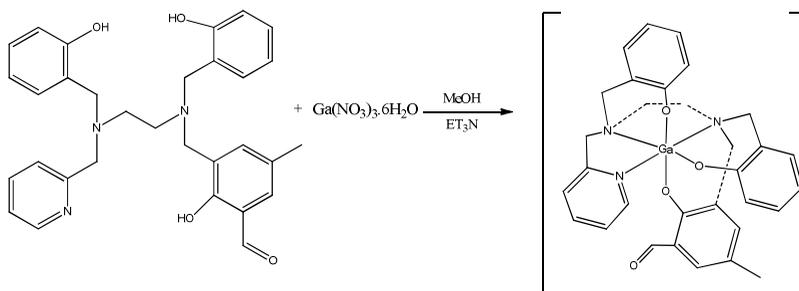
obteve-se o ligante H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> (2,50g) na forma de espuma amarela. O rendimento foi de 88% em relação ao precursor chamado 10.

Fonte: FONSECA, 2014

#### 4.2.2 Síntese do complexo mononuclear de H3LM3Ga

A uma solução do ligante H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> (0,27g, mmol) em metanol, foi adicionado, lentamente, 0,12g do sal Ga (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O. Na sequência, foram adicionados 10 mL de MeOH e a mistura permaneceu sob agitação por 1h. Ao final do tempo reacional, foi adicionado Et<sub>3</sub>N (Trietilamina) (0,4 mL) e a solução foi filtrada. O composto foi purificado por cristalização em éter etílico e foi obtido um sólido cristalino amarelo claro. Com 20% de rendimento.

Figura 8 - Equação da síntese do complexo mononuclear de H3LM3Ga



Fonte: FONSECA, 2014

### 4.3 CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas linhagens celulares de melanoma humano (SK-MEL-28 e SK-MEL-147) e linhagem imortalizada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). As linhagens de melanoma humano foram cedidas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - São Paulo. A linhagem de células endoteliais de veia umbilical humana foi adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ-UFRJ). O cultivo celular foi realizado em meios específicos (DMEM e RPMI) para cada linhagem, os meios foram suplementados com 10% de SFB, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina e 10 mM de HEPES. As células foram mantidas em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>, em atmosfera umidificada, a 37°C e pH 7.4. O método de exclusão por Azul de Trypan foi utilizado para checar as condições das células antes do início dos ensaios, através desta checagem observa-se o número de células viáveis, de tal forma que o corante azul incorpora-se nas células que eventualmente apresentem comprometimento de membrana (FRESHNEY, 2010). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer, sendo que o número de células e o tempo de incubação foram adaptados para cada tipo de ensaio.

### 4.4 TRATAMENTO CELULAR

O complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga e o ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), armazenados em alíquotas a 4°C. As células foram expostas aos compostos após a adesão em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, dependendo de cada experimento, sendo usado como controle negativo células incubadas somente com meio de cultura. A concentração final de DMSO foi de 0,1% em todos os casos.

### 4.5 VIABILIDADE CELULAR – ENSAIO DE MTT

O ensaio do MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é colorimétrico, clássico para avaliar a viabilidade celular. Baseia-se na utilização do corante MTT que é convertido em sal de formazan de cor púrpura após a clivagem do anel de tetrazólio, majoritariamente por desidrogenases mitocondriais. Assim, a reação

ocorre somente em células viáveis. O formazan púrpura formado é proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Neste experimento, procedeu-se utilizando placas de 96 poços onde foram semeadas ( $1 \times 10^4$  células/poço) e incubadas junto ao meio de cultura por 24, 48 e 72h. Os tratamentos com o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga e com o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  foram realizados nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu M$  com incubação a  $37^\circ C$ . Ao término desta incubação, o meio de cultura foi substituído pela solução de MTT (0,25  $\mu g/L$ ) em incubação adicional por 2 h a  $37^\circ C$ . Após esta etapa, a solução de MTT foi retirada e DMSO foi adicionado para solubilizar o precipitado formazan. A absorbância foi mensurada em 540 nm em leitor de placas (ELX800, BioteK, Vermont, EUA). A absorbância do grupo controle foi considerada como 100% de células viáveis. Portanto quanto maior a densidade óptica obtida no ensaio, maior o número de células viáveis. A concentração citotóxica que provoca a morte em 50% das células, foi calculada utilizando o *software GraphPad Prism 6* (La Jolla, CA, EUA) GPW6-242831-RBMZ-03274. Com os valores de  $CC_{50}$  definidos, foram encaminhados os demais ensaios tendo como parâmetro os valores obtidos.

#### 4.6 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (ENSAIO CLONOGÊNICO)

O ensaio de formação de colônias ou ensaio clonogênico tem como princípio a capacidade de uma única célula proliferar e formar colônia *in vitro*. O ensaio tem como finalidade avaliar a capacidade de cada célula sofrer divisão "ilimitada", sendo que só é classificado em colônia o grupo que tiver 50 células no mínimo. O ensaio é iniciado com tempo de incubação de 24h em placas de 6 poços com 600 células por poço (2 mL de meio de cultura suplementado). Passado esse tempo retira-se o meio de cultura e substitui-se por outro contendo o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga e o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  nas concentrações de 3,5 e 7,0  $\mu M$  e incubadas por 24h. O solvente DMSO a 0,1% e o meio de cultura foram aplicados como controles negativos. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS a  $37^\circ C$  (3 $\times$ ) e o meio foi novamente substituído por meio fresco, seguido de uma nova incubação, por cerca de 10 dias, ou até a verificação da presença de colônias (pelo menos uma colônia com cerca de 50 células), quando o ensaio foi finalizado. O procedimento seguinte consistiu na retirada do meio de cultura das placas, sendo as mesmas lavadas (tampão salina

fosfato 1× (PBS)) e as colônias visualizadas, foram fixadas (solução de glutaraldeído 6%) e coradas (solução de cristal violeta 0,2%). Fotografias foram tiradas para registrar o crescimento de colônias nos diferentes tratamentos e concentrações quando comparadas com o controle negativo e quantificadas (FRANKEN et al., 2006). Todos ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.7 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR

A atividade antimetastática de novas moléculas, consiste em uma avaliação muito relevante no estudo do câncer, em que pode ser investigada através de vários ensaios, entre estes menciona-se o de invasão celular. A capacidade de invasão celular foi avaliada utilizando-se *inserts* da Millicell® com filtro de policarbonato (12 µm) e poros de 8 µm. O lado superior do policarbonato do filtro de 60 µL foi revestido com Matrigel® (extrato de proteína da membrana basal) diluída 1:10 em DMEM gelado. Durante 30 minutos as câmaras foram incubadas a 37 °C, para a total formação de uma fina camada contínua de matrigel. As células ( $6 \times 10^4$  células/*insert*) foram incubados durante 24 h com o complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga e o ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> nas concentrações de 3,5 e 7,0 µM (1/4 e 1/2× a CC<sub>50</sub> respectivamente).

As células que estavam na superfície superior do filtro foram removidas com uma haste flexível de algodão. As células que invadiram a Matrigel® e atingiram a superfície inferior do filtro foram fixadas com glutaraldeído a 5 %, e coradas em solução de cristal violeta 0.5 %. As células foram visualizadas por meio de um microscópio de luz em 100 × (Nikon, Eclipse, TS100) e contadas em cada dez campos aleatoriamente.

#### 4.8 ANÁLISE DO TIPO DE MORTE CELULAR

A análise por citometria de fluxo utilizando o Kit de Anexina-V-FITC e iodeto de propídio (BD, EUA) é utilizada para avaliar o tipo de morte celular (Apoptose ou Necrose), baseada nas características de permeabilidade de membrana (VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000). A proteína Anexina-V conjugada ao fluorófilo FITC é um revelador de morte celular por apoptose. No início do processo apoptótico, ou seja nas células expostas a estímulos pró-apoptóticos, a fosfatidilserina é exteriorizada, isto é, passa do lado interno da membrana para o lado externo. Nesta condição pode-se já detectar o FITC-Anexina V - fosfatidilserina e revelar as células apoptóticas (HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013).

As células ( $3 \times 10^5$  células/poço) foram incubadas em placas de 12 poços, em incubadora a 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , no tempo de 24h e 48h para a total adesão de células na placa. Em seguida, as células foram tratadas com o complexo mononuclear de  $\text{H}_3\text{LM}_3$  Ga e ligante não-simétrico  $\text{H}_3\text{LM}_3$  nas concentrações 3,5 e 7,0  $\mu\text{M}$  por mais 24 h. O meio de cultura foi retirado logo após o período de incubação e as células transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas a  $200 \times g$  por 10 min a  $25^\circ\text{C}$ . Com o sobrenadante aparente foi possível retirá-lo e as células lavadas com PBS, novamente centrifugadas a  $180 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . Esse processo foi feito por duas vezes consecutivas para a retirada total do meio de cultura. Posteriormente, as células foram homogeneizadas com tampão de ligação e marcadas com Anexina-V-FITC por 15 min à  $4^\circ\text{C}$ . Para realização da leitura em citômetro de fluxo (FACS CANTO II, BD Biosciences) foi adicionado o iodeto de propídio (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A visualização e análise de células viáveis, apoptose, necrose ou apoptose/necrose em cada quadrante foi realizada através do programa Flowing 2.5.0.

#### 4.9 ENSAIO DA MEMBRANA CORIOALANTÓICA (CAM)

A avaliação da atividade antiangiogênica do complexo mononuclear de  $\text{H}_3\text{LM}_3$  Ga e do ligante não-simétrico  $\text{H}_3\text{LM}_3$  foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nguyen, Shing e Folkman (1994). Ovos fertilizados da espécie *Gallusdomesticus* foram incubados em uma incubadora automática e digital Chocmaster®, na posição horizontal, à temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação (idade embrionária E2), uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde a câmara de ar do ovo está localizada e assim, uma quantidade de cerca de 5 mL de clara foi retirada afim de evitar-se a aderência dos embriões nas membranas ovulares. Concomitantemente, outra janela foi aberta com aproximadamente 15 mm de diâmetro na região localizada acima da membrana corioalantóica. Com fita adesiva e fita isolante as janelas foram fechadas para minimizar a perda de umidade. Assim, os embriões foram incubados por mais 72 h para que alcançassem a fase embrionária de 6 dias (E6). Nesta fase, os ovos são abertos e implantados aos discos de metilcelulose (1,5%) adsorvidos com os compostos em estudo, exatamente no terço externo da membrana corioalantóica. Novamente foi fechado o espaço aberto para implantar o disco, e a incubação continuou por mais 48h, até que chegasse na idade embrionária de 8 dias

(E8) de experimento, quando se realizou a avaliação da atividade antiangiogênica. Uma câmera fotográfica acoplada a um estereomicroscópio com aumento de 20× capturou imagens, em que cada imagem em triplicata foi utilizada para a contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco e vasos presentes em uma área de 0,9 cm. Os resultados foram expressos como percentual de vasos  $\pm$  desvio-padrão da média.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

A determinação da quantidade de EROS consiste em uma técnica em que utiliza-se a sonda 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). A sonda foi adicionada nas células após incubação com o ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e o complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga. Esta sonda na forma reduzida não apresenta fluorescência, no entanto, em presença de EROS a mesma é oxidada, emitindo fluorescência de coloração verde (KALYANARAMAN et al., 2012).

Para a avaliação desta metodologia procedeu-se da seguinte forma: células na densidade de  $2 \times 10^5$  células/mL foram adicionadas a placas de 12 poços, 24 h depois foram incubadas com os compostos nas concentrações de CC<sub>50</sub> por 24h. Posteriormente, as células foram incubadas à 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A sonda DCFH-DA foi então adicionada às células, as quais foram incubadas novamente por mais 30 minutos. Logo após, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x.

#### 4.11 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS CASPASES 3, 8, 9 E 12

Neste experimento foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células e tratadas como ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e com o complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga. As concentrações estipuladas foram de CC<sub>50</sub> de cada composto em 24 h de incubação. Após as 24 h, as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de lise contendo HEPES 10 mM, KCl 42mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, PMSF 1mM, EDTA 100μM, EGTA 100μM, pepstatina A 1μg/mL, leupeptina 1μg/mL, aprotinina 5μg/mL, CHAPS 0,5% e DTT 1 mM por 10 minutos entre 4 e 8°C. Uma alíquota de 25μL deste lisado celular foi adicionada à 75μL do meio de reação contendo HEPES 25 mM, CHAPS 1%, EDTA 1 mM, sacarose 10% e DTT 3 mM. Após, os substratos fluorogênicos para as respectivas caspases foram adicionados: 10μM para a caspase 3 Ac-DEVD-AMC, 25μM para a

caspase 8 Ac-IETD-AMC, e 50  $\mu$ M para caspase 12 Ac-ATAD-AFC e 100  $\mu$ M para a caspase 9 Ac-LEHD-AFC seguido de incubação à 37°C por 120 minutos. A atividade destas caspases foi avaliada através da produção de produtos fluorescentes da clivagem dos substratos, monitorada através do espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55, com comprimento de onda de 380 nm para excitação e 465 nm para emissão.

#### 4.12 ANÁLISE DA QUANTIDADE DE PROTEÍNA VEGF POR IMUNOELETOFORESE

Neste experimento, células foram plaqueadas e 24 horas após, tratadas com o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga e com o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$ . As células presentes no controle negativo foram tratadas com meio de cultura e veículo (DMSO a 0,25%). As células foram expostas ao complexo mononuclear de  $[GaH_3LM_3]$  e ao ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  pelo período de 24h. As células foram lavadas com PBS três vezes e lisadas com tampão RIPA (Tris-Cl 25 mM, desoxicolato de sódio 0,25%, NP40 1%, NaCl 150 mM, e fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM) em pH 7,4 enriquecido de coquetel inibidor de proteases e fosfatases. As amostras foram desnaturadas em tampão com pH 6,8 composto por Tris-HCl 60 mM, dodecil sulfato de sódio 2% (SDS), glicerol 10%,  $\beta$ - mercaptoetanol 5% e c.

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão da média de determinações feitas em triplicata e cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. Utilizando o programa Graphpad Prisma® foram também realizadas comparações estatísticas por meio da análise de variância *one-way* ANOVA, seguida do teste de Dunnet para comparar todos os diferentes grupos com o grupo controle. A significância estatística foi considerada em  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quimioterapia do câncer baseia-se na utilização de agentes citotóxicos para destruir as células neoplásicas, porém a falta de seletividade dos fármacos acarreta toxicidade aos pacientes. (OCTAVIA et al., 2012). Atualmente, diferentes estratégias, incluindo abordagens cirúrgicas, terapia fotodinâmica, radiação e compostos de origem natural têm sido amplamente utilizados para gerir o comportamento do tumor no corpo humano. Visando complementar as terapias citotóxicas convencionais, novos fármacos vêm sendo desenvolvidos, cujos mecanismos de ação compreendem o bloqueio da invasão celular, da angiogênese, ou vias de sinalização celular (CHERAGHI et al., 2016).

São poucas as terapias existentes para o melanoma que se mostram eficazes no combate de metástases ou que contribuam na qualidade e aumento na expectativa de vida dos pacientes. Assim, com o propósito de avançar na prospecção de novas terapias para o melanoma, este estudo teve como alvo avaliar a relação do efeito antitumoral e antiangiogênico do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga.

As linhagens tumorais de melanoma humano SK-MEL 28 e SK-MEL 147 possuem mutações como aquelas presentes em pacientes com melanoma maligno. A mutação presente na SK-MEL 28 é em BRAFV600E e na SK-MEL 147 em N-RASQ61R (DAVIES et al., 2002; LEE; CHOI; KIM, 2011).

Dados relacionados a 136 pacientes com melanoma e mutação em N-RAS, apresentaram também mutação no éxon 2 (códon 60 e 61) (Q61R) (BUCHHEIT et al., 2013). Relacionada diretamente com mutação em B-RAF,  $V^{600E}$  mutado, está presente em 70% dos casos de melanoma. Neste sentido, foi utilizado no presente estudo o fármaco de referência vemurafenibe apenas na linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 28, considerando que o vemurafenibe é um

quimioterápico utilizado para pacientes que apresentam mutações em B-RAF<sup>V600E</sup>, e somente a linhagem SK-MEL-28 apresenta esta mutação.

## 5.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO

### 5.1.1 Avaliação da viabilidade celular

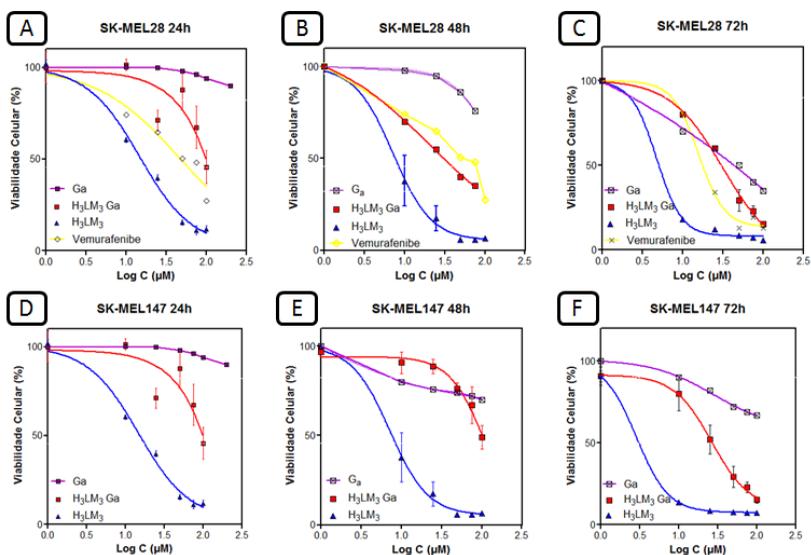
A fim de caracterizar os compostos que apresentavam 50% de citotoxicidade em células (CC<sub>50</sub>), essa capacidade foi determinada pelo ensaio do MTT, baseado em verificar majoritariamente a atividade mitocondrial e assim indicando a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os resultados referentes à atividade citotóxica apresentada, pelo nitrato de Gálio (Ga (III)), pelo complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga, ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e pelo fármaco de referência vemurafenibe (controle positivo), sobre linhagens celulares SK-MEL 28 em 24, 48 e 72h, estão apresentados na Figura 9-A, -B e -C.

Os resultados obtidos evidenciaram que o complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 µM, foi mais citotóxico quando comparado com os efeitos do nitrato de gálio (Ga(III)). Além disso, o complexo mononuclear foi tão potente quanto, o fármaco de referência vemurafenibe, de forma dependente do tempo para a linhagem tumoral de melanoma (SK-MEL 28). O ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub>, apresentou um perfil citotóxico superior em relação a todos os compostos testados. Isso se deve ao suposto fato de que como no tratamento do câncer, muitos fármacos são compostos orgânicos, e os ligantes livres podem ser tão ou mais ativos que seus respectivos complexos (Tabela 2).

Em relação à linhagem tumoral de melanoma (SK-MEL 147), o complexo mononuclear H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100 µM, foi mais citotóxico do que os sais de nitrato de gálio (Ga (III)). O ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> também apresentou elevada atividade citotóxica quando comparado com os compostos estudados, como pode ser observado na Figura 9-D, E e F pelo perfil de queda acentuada das curvas de inibição (Tabela 3).

Figura 9 - Avaliação da citotoxicidade.



A Citotoxicidade do complexo H3LM3 Gado ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub>, Nitrato de Gálio (Ga(III)), Nitrato de Índio (In(III) e do quimioterápico vemurafenibe sobre linhagens tumorais de melanoma humano SK-MEL 28 após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de incubação. E citotoxicidade do complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga, do ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub>, Nitrato de Gálio (Ga(III)) e Nitrato de Índio (In(III), sobre linhagens tumorais de melanoma humano SK-MEL 147 após 24 h (D), 48 h (E) e 72 h (F) de incubação. Os resultados expressam a média ± desvio-padrão. Valores de \*\*\*p<0,001 foram estatisticamente significativos quando comparados com o mesmo grupo nas células controle. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Elaboração Própria

Um perfil parecido destes mesmos compostos foi descrito por Fonseca (2014), em que foi demonstrado que o mais ativo, mesmo nas menores concentrações, foi o ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> na linhagem tumoral B16F10 (linhagem celular de melanoma). Na maior concentração testada, 50 µM, o ligante diminui a viabilidade celular em 89%, enquanto que no complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga diminui em apenas 17%. Na linhagem celular de leucemia murina (L1210), o comportamento dos compostos é diferente. Neste caso, o complexo não potencializou a atividade do ligante e a cisplatina é mais tóxica que os dois compostos sintetizados. Interessantemente, o complexo mononuclear H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga, apesar de não potencializar a atividade do ligante é mais citotóxico para a linhagem leucêmica do que para a de melanoma.

Em outro estudo, compostos similares (H<sub>3</sub>L<sub>3</sub> e GaL<sub>3</sub>), o ligante e o complexo de gálio(III) foram testados em células leucêmicas (U937). Os resultados obtidos demonstram que os compostos têm atividade em concentrações entre 20 e 40 µM. Perfil parecido com os compostos testados aqui, demonstraram atividade em uma faixa de concentração entre 10 e 50 µM (TERRA, 2012). Convém salientar que os tempos de incubação das células bem como as linhagens celulares são diferentes das condições dos ensaios aqui apresentados.

Um dos fatores que parece reger esta atividade do complexo mononuclear de gálio H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga é a presença do íon Ga (III), que se torna lábil, em pH fisiológico (FONSECA, 2014).

Tabela 2 - Valores de CC50 (µM) em SK-MEL 28

<b>SK-MEL 28 / CC<sub>50</sub> (µM)</b>			
Compostos	24h	48h	72h
Ga	> 100	> 100	30 ± 3
Vemurafenibe	34 ± 1	30 ± 2	15 ± 1
H <sub>3</sub> LM <sub>3</sub>	14 ± 1	6 ± 3	3 ± 1
H <sub>3</sub> LM <sub>3</sub> Ga	50 ± 3	25 ± 8	25 ± 3

CC50 determinadas para Ga (III), o ligante  $H_3LM_3$ ,  $H_3LM_3$  Ga e o quimioterápico Vemurafenibe em linhagens celulares SK-MEL 28 sob incubação de 24, 48 e 72h.

Fonte: Elaboração Própria

Tabela 3 - Valores de CC50 ( $\mu$ M) em SK-MEL 147

<b>SK-MEL 147 / CC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>M)</b>			
<b>Compostos</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
Ga	> 100	> 100	> 100
$H_3LM_3$	16 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	5 $\pm$ 3
$H_3LM_3$ Ga	50 $\pm$ 5	47 $\pm$ 3	23 $\pm$ 8

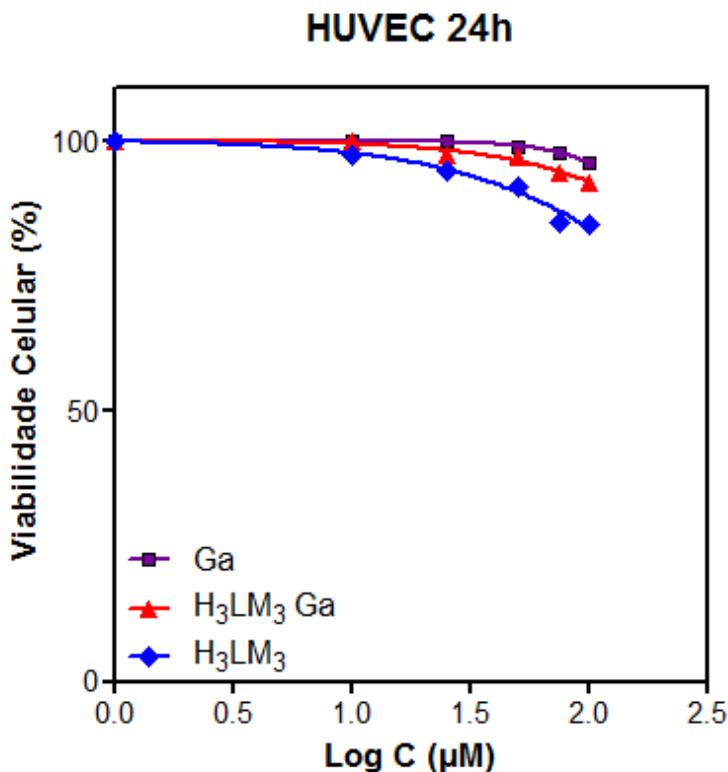
CC50 determinadas para Ga (III), o ligante  $H_3LM_3$ , e  $H_3LM_3$ Ga em linhagens celulares SK-MEL 147 sob incubação de 24, 48 e 72h.

Fonte: Elaboração Própria

A linhagem não tumoral imortalizada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) foi utilizada como comparativo para avaliação citotóxica com as linhagens tumorais (Figura 10). Essa análise com uma linhagem não tumoral é importante para a avaliação das moléculas, uma vez que até o momento, a maioria dos quimioterápicos destrói também as células saudias, o que resulta nos indesejados efeitos tóxicos (BAI et al., 2009; ROSEN et al., 2013).

O complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga e o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e Nitrato de Gálio (Ga (III)) nas concentrações de 1, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu$ M, não apresentaram resultados significativos de citotoxicidade sobre a linhagem não tumoral HUVEC, isto é, a viabilidade celular manteve-se em aproximadamente 80% até a concentração de 100  $\mu$ M.

Figura 10 - Citotoxicidade em linhagem celular HUVEC



Citotoxicidade do complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga, do ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e Nitrato de Gálio (Ga (III)) sobre linhagem imortalizada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT e o tempo de incubação foi de 24h. Os resultados expressam a média ± desvio-padrão. Valores de \*\*\*p<0,001 foram estatisticamente significativos quando comparados com o mesmo grupo nas células controle. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Elaboração Própria

A busca por fármacos antitumorais que proporcionem efeitos desejados e que apresentem formas seguras de inibir o crescimento celular indesejado, ainda se faz necessária. É de extrema necessidade que as novas moléculas possam atuar somente nas células cancerígenas e minimamente nas células saudáveis (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2014). Neste sentido, as moléculas aqui avaliadas, pelo menos em concentrações relativamente baixas, atendem a este quesito contra esta linhagem não-tumoral HUVEC.

### 5.1.2 Avaliação do tipo de morte celular induzida

Com intuito de caracterizar os tipos de morte celular induzidos pela atividade dos compostos em análise, foi utilizado o kit FITC-Anexina V; que mediante a técnica de citometria de fluxo pode determinar a porcentagem de células em cada condição: células viáveis, em apoptose ou em necrose.

No caso de células em apoptose, o fosfolípido fosfatidilserina (PS) é externalizado indicando que as células devem ser fagocitadas pelo sistema imunológico. Este mecanismo é utilizado para a avaliação da morte celular. Para isso, usa-se a anexina V, uma proteína recombinante, que se liga a fosfatidilserina, interagindo fortemente e especificamente com resíduos deste fosfolípido de membrana, através de suas cargas negativas, em presença de cálcio (HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013). O iodeto de propídeo (IP) é um marcador usado para distinguir células viáveis das não viáveis. Células viáveis excluem o IP da membrana. Células mortas ou danificadas podem ser penetradas pelo IP. Células que são positivas para FITC-Anexina V e negativas para IP estão em estágio inicial de apoptose. Células que são positivas para FITC-Anexina V e IP estão em estágio final de apoptose, em necrose ou estão mortas. Células que são negativas para FITC-Anexina V e IP estão viáveis ou não sofreram alterações na membrana celular.

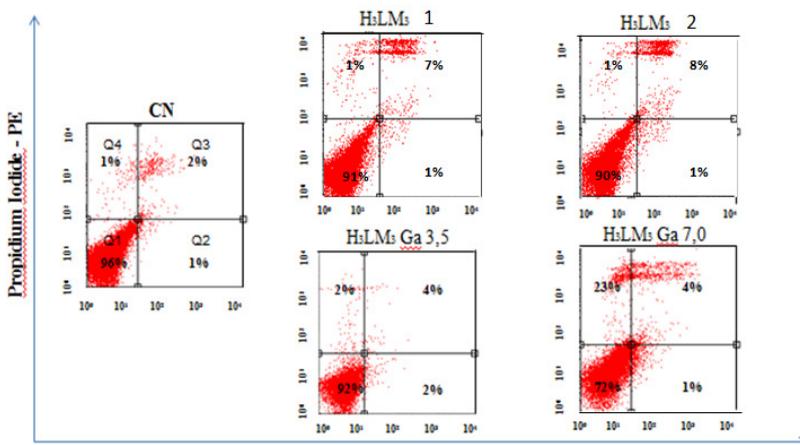
Para o experimento de análise do tipo de morte celular, foi analisado o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga e o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  para comparação.

A Figura 11 apresenta os dados de avaliação do tipo de morte celular do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  sobre a linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 28 em 24h de incubação. Através desta avaliação pode-se dizer em quais condições as células encontram-se, dependendo do quadrante no qual as mesmas estão posicionadas.

Células no quadrante inferior esquerdo (Q1) são células viáveis, células no quadrante inferior direito (Q2) são células em apoptose, células no quadrante superior direito (Q3) são células em apoptose/necrose e células no quadrante superior esquerdo (Q4) são células em necrose. Através desta análise observou-se que, na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , 7% das células estão possivelmente em morte celular por necroptose visto no quadrante superior direito (Q3), e na concentração de 2  $\mu\text{M}$  observou-se 8% de células em característica semelhante de necroptose (Q3). A avaliação feita

Tipo de morte celular induzida pelo ligante não-simétrico  $\text{H}_3\text{LM}_3$  e o complexo mononuclear de  $\text{H}_3\text{LM}_3$  Ga sobre linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL28. O ensaio foi realizado por citometria de fluxo em tempo de incubação de 24 h.. As análises foram realizadas pelo software Flowing (2.5)

Figura 11 - Determinação do tipo de morte celular induzida pelo  $\text{H}_3\text{LM}_3$  e  $\text{H}_3\text{LM}_3$  Ga em SK-MEL 28 em 24h.



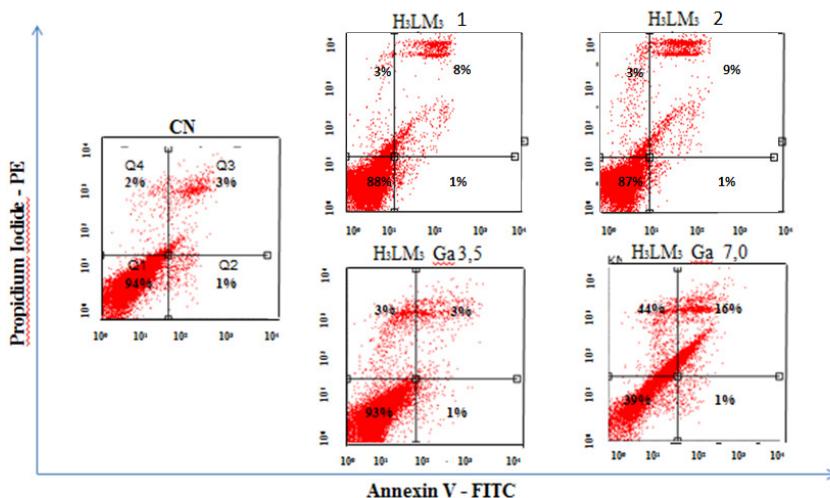
Fonte: Elaboração Própria

Na Figura 12, observa-se que, em relação ao controle, o ligante não-simétrico  $\text{H}_3\text{LM}_3$  na concentração de 1  $\mu\text{M}$  provocou aumento na quantidade de células em necroptose (Q3), aproximadamente 8%. Um pequeno aumento foi observado com 2  $\mu\text{M}$ , em que 9% das células apresentaram-se em necroptose (Q3).

Quando o complexo mononuclear de  $\text{H}_3\text{LM}_3$  Ga foi avaliado, a quantidade de células em necroptose (Q3) na concentração de 3,5  $\mu\text{M}$  foi de 3%, já na concentração de 7,0  $\mu\text{M}$  foi de 16% de células em necroptose. Esses resultados foram realizados em 24h de incubação dos

compostos sobre a linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 147, como observa-se na figura 12 em seguida.

Figura 12 - Determinação do tipo de morte celular induzida pelo H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga em SK-MEL 147 em 24h.



Tipo de morte celular induzida pelo ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e o complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga sobre linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 147 em 24h. O ensaio foi realizado por citometria de fluxo. As análises foram realizadas pelo software Flowing (2.5)

Fonte: Elaboração Própria

Tendo como base os resultados mostrados que foram obtidos por meio de ensaios frequentemente utilizados para definir a forma pela qual as células tumorais estão morrendo, conclui-se que os compostos estudados realmente levam a morte celular por necroptose em células de melanoma em baixas concentrações. Além disso, relatos da literatura apontam que um dos tipos de estímulos de estresse físico-químico que pode iniciar o processo necroptótico é provocado por agentes que causam dano ao DNA e conseqüentemente morte celular (CHO; CHALLA; MOQUIN et al., 2009; ZHANG; ZHOU; MCQUADE, 2011; VANDEN BERGHE; VANLANGENAKKER; PARTHOENS, 2010; VANTIEGHEM; ASSEFA; VANDENABEELE, 1998). Portanto, sabe-se que a indução de necroptose é uma importante defesa contra o câncer e os resultados aqui mostrados são promissores.

Até agora, neste trabalho foi demonstrado que tanto o ligante quanto o complexo podem induzir citotoxicidade celular supostamente pelo tipo de morte celular necrótica em células alvo nas concentrações citotóxicas referentes a cada composto.

### 5.1.3 Ensaio de Invasão Celular

O conhecimento da invasão celular é de fundamental importância para o melhor entendimento da metástase. Esse fato é crítico quando relacionado ao crescimento tumoral (HAOQIANG LAI et al., 2015). Com isso, se faz necessária a avaliação da capacidade antimetastática com experimentos *in vitro* que possam verificar a penetração celular de novos compostos em estudo. A atividade antimetastática de novos compostos está indiretamente relacionada a avaliação da capacidade invasiva das células. No entanto, para a certificação de que a migração celular ocorre independentemente da citotoxicidade do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga, o ensaio de invasividade celular foi realizado em concentrações menos citotóxicas dos compostos.

Assim sendo, foi analisada a capacidade do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga de invadir e atravessar o Matrigel®, que consiste em uma membrana de 8  $\mu$ m. Utilizou-se a concentração de 1  $\mu$ M para avaliação do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e 3,5  $\mu$ M para o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga. Nestas condições, evitou-se que o efeito citotóxico prejudicasse a análise, ou seja a viabilidade celular mante-se em ~80%.

Através dos resultados que estão apresentados na Figura 12, observou-se que o complexo mononuclear  $H_3LM_3$  Ga apresentou significativa inibição de invasão celular quando comparado com o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$ , o complexo mononuclear impediu a invasão celular no Matrigel®, diferentemente do controle, em que as células conseguiram invadir esta barreira facilmente. Observou-se que o complexo mononuclear  $H_3LM_3$  Ga reduziu em 58% a invasão celular, da linhagem celular de melanoma humano SK-MEL 28 em 24h de incubação, enquanto o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  reduziu apenas 5%.

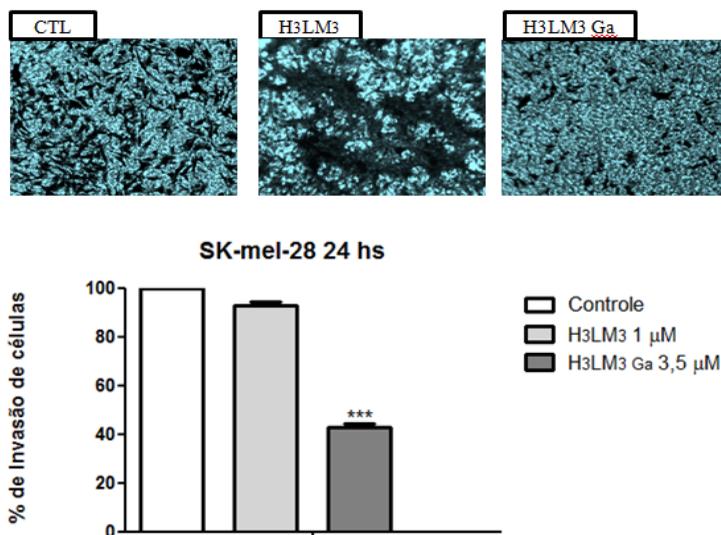
Na linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 147 em 24h de incubação, o complexo mononuclear  $H_3LM_3$  Ga apresentou o melhor perfil de inibição na invasão celular, quando comparado com o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$ . Obteve-se 10% de inibição na invasão celular do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$ , seguido do complexo

mononuclear H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga que apresentou 90% de inibição na invasão celular (Figura 13).

Os resultados apresentados em relação a ação dos compostos são bastante promissores, pois apresentam um potencial antimetastático, contudo fazem-se necessários estudos adicionais que possam confirmar o mecanismo molecular de de inibição da invasividade das linhagens SK-MEL 28 e SK-MEL 147.

Por outro lado, tem sido mostrado que o aumento da fosforilação de STAT3 desencadeia o desenvolvimento do melanoma, neste sentido seriam interessantes ensaios com compostos que atuassem na redução desta fosforilação, junto a isso a diminuição da atividade das metaloproteinasas 2 e 9 que estão relacionadas a migração e invasão celular (CAO et al. 2014).

Figura 13 - Efeito de H3LM3 e H3LM3Ga na invasão celular em SK-MEL 28

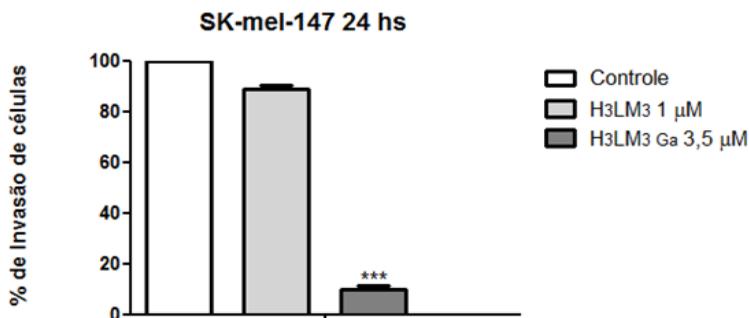
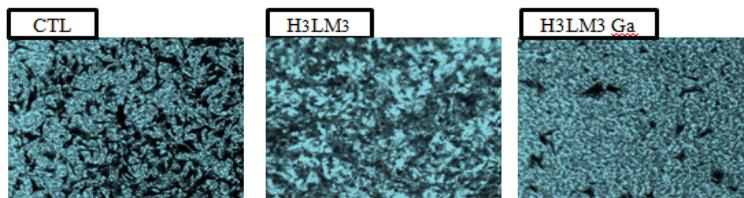


A) Células SK-MEL 28 foram incubadas na concentração de 3,5 μM por 24h. Posteriormente, as células que invadiram o Matrigel® foram coradas com cristal violeta. A) Células marcadas, após 24h de incubação com os compostos testados. O controle representa células sem tratamento. Fotomicrografias com ampliação de 100X representam dados de um experimento. B) Quantificação das células que invadiram o Matrigel® foram observadas com o programa Image J. Os resultados expressam a média ± desvio-padrão de três experimentos independentes. Valores de \*\*\*p<0,001 em relação ao percentual de invasão

apresentada pelo grupo controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Elaboração Própria

Figura 14 - Efeito de H3LM3 e H3LM3Ga na invasão celular em SK-MEL



Células SK-MEL 147 foram incubadas na concentração de 3,5  $\mu$ M por 24h. Depois disso, as células que invadiram o Matrigel® foram coradas com cristal violeta. A) Células marcadas, após 24 h de incubação com os compostos testados. O controle representa células sem tratamento. Fotomicrografias com ampliação de 100X representam dados de um experimento. B) Quantificação das células que invadiram o Matrigel® foram observadas com o programa Image J. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio-padrão de três experimentos independentes. Valores de \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao percentual de invasão apresentada pelo grupo controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Elaboração Própria

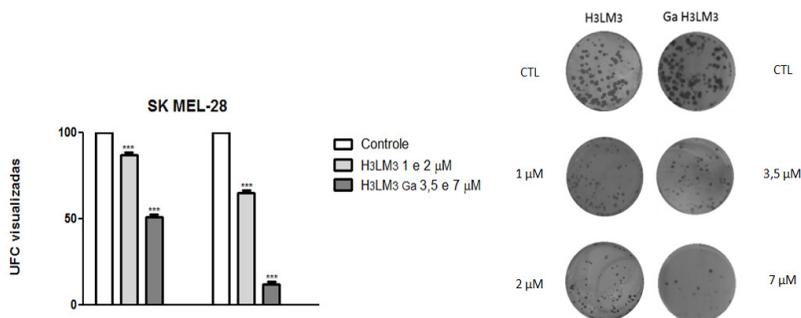
#### 5.1.4 Ensaio de Colônia (Ensaio Clonogênico)

O ensaio clonogênico foi primeiramente descrito na década de 60 por radiologistas que desejavam avaliar a radiosensibilidade de

linhagens tumorais *in vitro* (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005). Entretanto, baseado na capacidade de uma única célula proliferar-se e tornar-se uma colônia, este ensaio é também comumente utilizado para determinar os efeitos de agentes citotóxicos e de outros agentes terapêuticos antineoplásicos na capacidade de formação de colônias (RAFEHI et al., 2011).

Os resultados referentes à avaliação da atividade antiproliferativa do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga sobre as linhagens celulares de melanoma humano SK-MEL 28 e SK-MEL 147, estão representados nas Figuras 13 e 14, respectivamente. Como pode-se observar o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  apresentou apenas 20% de efeito antiproliferativo a partir da concentração de  $1 \mu M$ . Sendo tal proliferação mais inibida (em torno de 40%) na concentração de  $2 \mu M$  sobre SK-MEL 28. A avaliação feita em SK-MEL 28 do complexo mononuclear  $H_3LM_3$  Ga mostrou o efeito de inibição de formação de colônias significativo, em concentrações de  $3,5 \mu M$  a redução foi de 50% de colônias e na concentração de  $7,0 \mu M$  a inibição de formação de colônias foi de 85%.

Figura 15 – Efeito de  $H_3LM_3$  e  $H_3LM_3$  Ga na formação de colônia em células SK-MEL 28

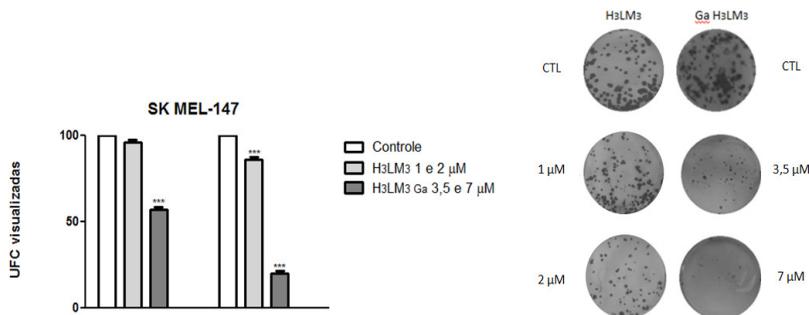


Efeito de  $H_3LM_3$  e  $H_3LM_3$ Ga sobre a capacidade de proliferação de células SK-MEL 28 em 10 dias de tratamento. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio-padrão de três experimentos independentes. Valores de  $***p < 0,001$  em relação ao percentual do número de unidades formadoras de colônia (UFC) apresentada pelo grupo controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Elaboração Própria

Um perfil semelhante foi observado nos dados demonstrados na figura 15, referente ao ensaio de formação colônia dos compostos em células SK-MEL 147. O ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> apresentou apenas 1% de efeito antiproliferativo a partir da concentração de 1 µM. Sendo

Figura 16 - Efeito de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga na formação de colônia em células SK-MEL 147.



tal proliferação mais inibida (em torno de 10%) na concentração de 2 µM sobre SK-MEL 147. A avaliação feita em SK-MEL 147 do complexo mononuclear H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga mostrou o efeito de inibição de formação de colônias significativo, em concentrações de 3,5 µM a redução foi de 48% de colônias e na concentração de 7,0 µM a inibição de formação de colônias foi de 78%.

Efeito de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub>Ga sobre a capacidade de proliferação de células SK-MEL 147 em 10 dias de tratamento. Os resultados expressam a média ± desvio-padrão de três experimentos independentes. Valores de \*\*\*p<0,001 em relação ao percentual do número de unidades formadoras de colônia (UFC) apresentada pelo grupo controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Elaboração Própria

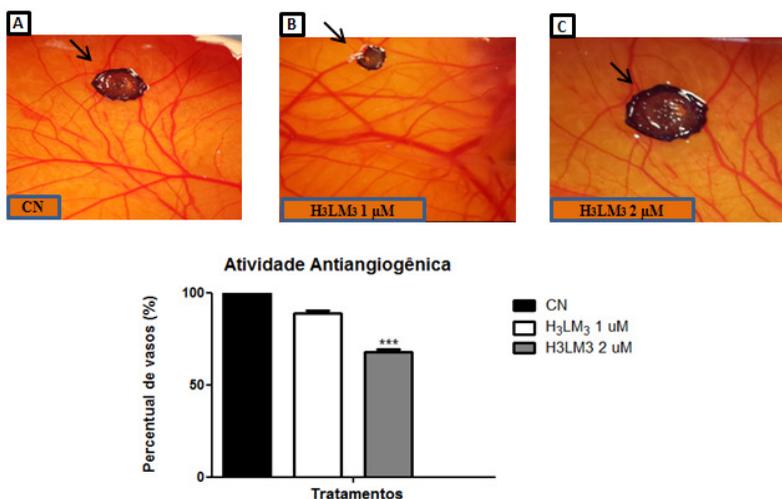
Vários mecanismos têm sido descritos para explicar a morte celular; no entanto, a perda da capacidade de proliferação é a característica mais comum. Assim, uma célula que mantém a capacidade de sintetizar proteínas e DNA, através de uma ou duas mitoses, mas não é capaz de dividir-se e produzir um grande número de células, é considerada morta. Isto é muito frequentemente referido como perda de “integridade reprodutora” ou “morte de reprodução” (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005).

### 5.1.5 Ensaio da Membrana Corioalantóica (CAM)

Como verificamos anteriormente, os compostos aqui analisados não são citotóxicos a linhagem celular endotelial HUVEC, que embora seja humana, conserve características comuns de células endoteliais não tumorais, isso nos permite a análise do ensaio de antiangiogenicidade, mesmo usando embrião de galinha, e a possível inibição da expressão gênica não seria devido a citotoxicidade.

Este ensaio permite avaliar a atividade antiangiogênica que está representada nas Figuras 17 e 18. Como pode-se observar, o ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> quando administrado nas concentrações de 1 e 2 μM promoveram forte ação antiangiogênica, de 73% e 84%, já o complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga apresentou alto potencial antiangiogênico, o qual ocorre de maneira dependente de dose, uma vez que tratamentos realizados com este complexo nas concentrações de 3,5 e 7,0 μM foram capazes de reduzir o número de vasos em torno de 84% e 94%, respectivamente.

Figura 17 - Atividade Antiangiogênica apresentada pelo ligante H3LM3.

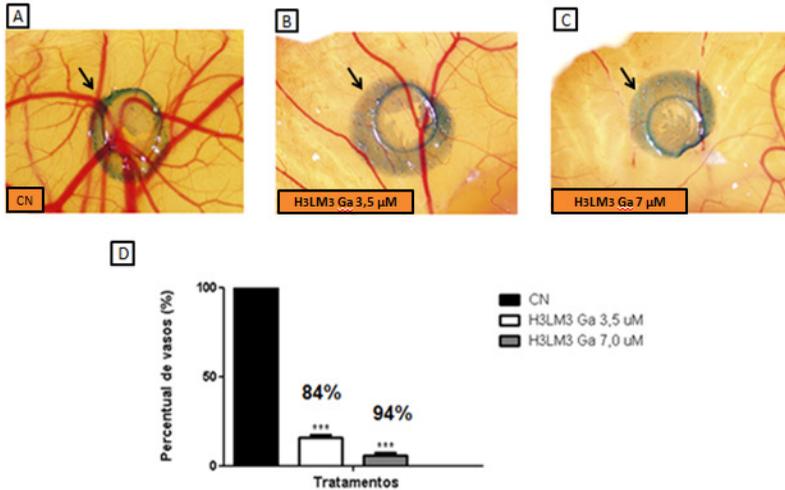


Imagens fotográficas mostrando o efeito do ligante não simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> sobre a angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de *G. domesticus* na idade de 8 dias (E8). Um único suporte discoide de metilcelulose (seta) contendo as substâncias sob estudo, foi implantado no 6° dia de incubação (E6) no terço externo de cada membrana, onde capilares sanguíneos ainda estavam crescendo (A) Controle (Veículo e corante); (B) Ligante não simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> – 1 μM; (C) Ligante não simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> – 2; (D) Efeitos das substâncias acima em

relação ao grupo controle (100%). Os resultados foram expressos em percentagem de vasos sanguíneos no limite do disco – suporte. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Valores de  $***p < 0,001$  denota uma inibição estatisticamente significativa da angiogênese em relação ao controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Elaboração Própria

Figura 18 - Atividade Antiangiogênica apresentada pelo complexo mononuclear de H3LM3Ga



Imagens fotográficas mostrando o efeito do ligante não simétrico H3LM3 Ga sobre a angiogênese na membrana corioalantóica do embrião de *G. domesticus* na idade de 8 dias (E8). Um único suporte discoide de metilcelulose (seta) contendo as substâncias sob estudo, foi implantado no 6° dia de incubação (E6) no terço externo de cada membrana, onde capilares sanguíneos ainda estavam crescendo (A) Controle (Veículo e corante); (B) Complexo mononuclear de H3LM3 Ga – 3,5 µM; (C) Complexo mononuclear de H3LM3 Ga – 7; (D) Efeitos das substâncias acima em relação ao grupo controle (100%). Os resultados foram expressos em percentagem de vasos sanguíneos no limite do disco – suporte. Cada coluna e barra vertical representam respectivamente a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. Valores de  $***p < 0,001$  denota uma inibição estatisticamente significativa da angiogênese em relação ao controle negativo. O teste estatístico utilizado foi ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnet.

Fonte: Elaboração Própria

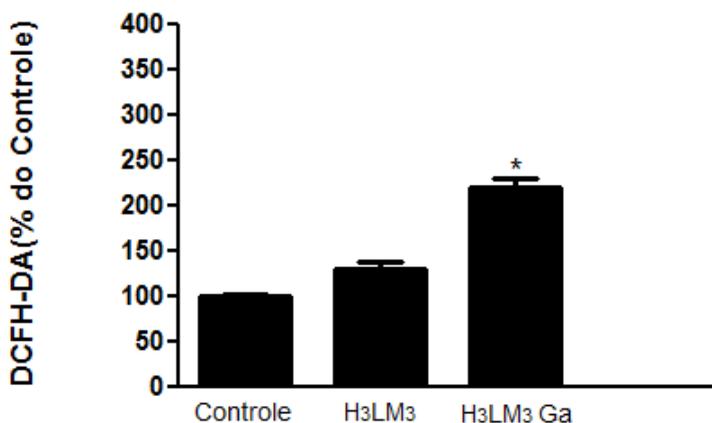
Por fim, sugere-se que os efeitos citotóxicos, antiproliferativo e anti-metastático do complexo mononuclear  $H_3LM_3$  Ga, pode ser decorrente de dois mecanismos que podem atuar concomitantemente: a inibição da expressão de VEGF e dano ao DNA. Outras ações destes compostos não podem ser descartadas.

Ressalta-se a necessidade da realização de ensaios adicionais para confirmar a hipótese levantada, conforme mencionados nas perspectivas desse trabalho.

### 5.1.6 Determinação da concentração intracelular de EROs

A Figura 19 mostra que o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga frente a linhagem tumoral SK-MEL 28 durante 24 h de incubação, atuaram aumentando a concentração de EROs nas células, o complexo mononuclear  $H_3LM_3$  Ga destacando-se frente ao ligante. Sugere-se, portanto, que este aumento está relacionado com a atividade antitumoral e a morte celular por necroptose exercida pelos compostos.

Figura 19 - Conteúdo celular de EROs em células SK-MEL 28

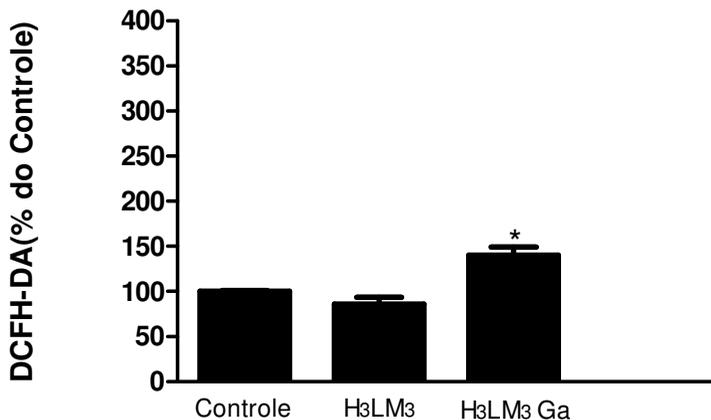


Determinado após 24 h de tratamento com o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  (1  $\mu$ M) e com o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga (3,5  $\mu$ M). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  DP de três experimentos independentes (\*p < 0,05) em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaboração Própria

O mesmo não foi possível observar na Figura 20 quanto ao aumento de formação de EROS do ligante não-simétrico  $H_3LM_3$ . Em relação ao complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga foi possível observar o aumento de EROS frente a células de melanoma humano SK-MEL 147 no tempo de 24 h de incubação.

Figura 20 - Conteúdo celular de EROS em células SK-MEL 147



Determinado após 24 h de tratamento com o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  (1  $\mu M$ ) e com o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga (3,5  $\mu M$ ). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  DP de três experimentos independentes (\* $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle.  
Fonte: Elaboração Própria

Efetivamente o complexo mononuclear  $H_3LM_3$  Ga elevou a concentração intracelular de EROS de maneira significativa nas duas linhagens tumorais, sugerindo que os efeitos citotóxico e antiproliferativo apresentados pelo  $H_3LM_3$  Ga, estariam ligados à indução de estresse oxidativo via ciclo redox ativado. Ocorrendo algum tipo de alteração no equilíbrio do ciclo redox, que pudesse levar a produção de peróxidos e radicais livres, certamente resultaria em danos aos componentes celulares, como lipídios, proteínas e DNA.

Contudo, estas diferentes atividades podem contribuir para o melhor entendimento de uma suposta via de sinalização destes complexos. Ressalta-se que espécies reativas de oxigênio (EROs), foram dadas como moduladores endógenos de VEGF-2, assim foram

identificados a desempenhar um papel importante na angiogênese (LAI et al., 2015).

A sinalização para necroptose pode envolver diferentes alterações metabólicas, incluindo os processos associados as mitocôndrias e a superprodução de EROs que pode levar ao dano de macromoléculas e consequentemente ocorreria a morte por necroptose (CHO YS, CHALLA S, MOQUIN D. et al., 2009).

Já em relação ao desencadeamento da via extrínseca da apoptose, já foi evidenciado que as EROs atuam aumentando a expressão de receptores de morte como TRAIL e FAS (HSIEH et al., 2011; LAUX; NEL, 2001; LEE; CHOI; KIM, 2011).

### 5.1.7 Avaliação da Atividade das caspases 3, 8, 9 e 12

Os resultados referentes à mensuração da atividade das caspases 3, 8, 9 e 12 após incubação das células SK-MEL 28 com ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e do complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga, são apresentados a seguir:

Como pode-se observar na Figura 21, nenhum dos compostos foi capaz de aumentar significativamente a atividade de caspases em relação ao grupo controle.

O mesmo observou-se na Figura 22, depois da incubação com o ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e do complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga, sobre linhagens de melanoma humano SK-MEL 147.

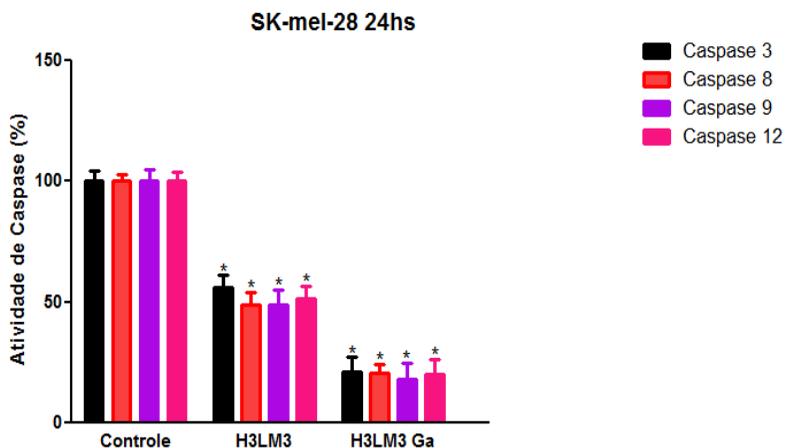
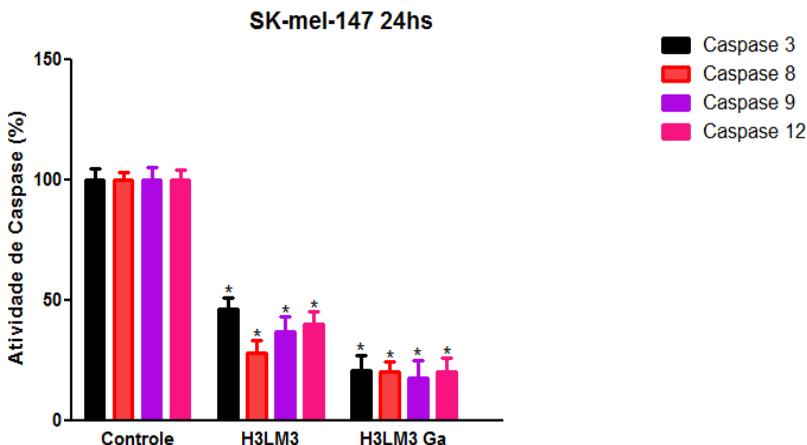


Figura 21- Efeito do ligante não-simétrico H3LM3e do complexo mononuclear de H3LM3 Ga sobre as atividades das caspases 3, 8, 9, 12 após o tratamento de células SK-MEL 28.

Os valores foram obtidos de acordo com a fluorescência emitida e expressos na forma de porcentagem em relação ao controle, que foi considerado 0%. Em concentração de 3,5  $\mu\text{M}$  para os dois compostos. Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  DP de três experimentos independentes (\*\*\*) em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaboração Própria

Figura 22 - Efeito do ligante não-simétrico H3LM3e do complexo mononuclear de H3LM3 Ga sobre as atividades das caspases 3, 8, 9, 12 após o tratamento de células SK-MEL 147.



Os valores foram obtidos de acordo com a fluorescência emitida e expressos na forma de porcentagem em relação ao controle, que foi considerado 0%. Em concentração de 3,5  $\mu\text{M}$  para os dois compostos. Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  DP de três experimentos independentes (\*\*\*) em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaboração Própria

Os resultados relatados neste estudo evidenciam que o ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e o complexo mononuclear de H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> Ga atuam independentemente das atividades das caspases 3, 8, 9 e 12 anulando a possibilidade de que esses compostos poderiam ativar as vias intrínsecas e extrínsecas, já que se sabe que a ativação de caspases possivelmente levariam a indução das duas vias. Dados obtidos deste estudo junto ao fato que a via intrínseca da apoptose é dependente de ATP, sugere-se que os tratamentos com o ligante não-simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e do complexo

mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$ , bloquearam a via mitocondrial, impedindo a formação do apoptossomo e assim a não ativação das caspases 3, 8, 9 e 12. Outra hipótese seria da formação de EROs a partir do ciclo redox que poderiam atuar na oxidação de resíduos de cisteína, inativando assim as atividades enzimáticas (VERRAX et al., 2011). Salienta-se a necessidade de realização de novos experimentos para confirmar as hipóteses aqui levantadas.

Por fim, sugere-se que o provável mecanismo de morte envolvido na atividade citotóxica e antiproliferativa mediadas por esses compostos trata-se de necroptose, pois quando a ativação das caspases é inibida devido alterações genéticas ou farmacológicas, RIP1 forma um complexo em conjunto a RIP3 para alimentar o caminho de transdução de sinais necroptóticos (ZHANG H, ZHOU X, MCQUADE T, et al., 2011; KAISER WJ, UPTON JW, LONG AB. et al., 2011). No entanto, não se pode descartar o mecanismo de morte celular por ferroptose, uma vez que o gálio pode estar interferindo na atuação do ferro, além do que este tipo de morte também envolve a produção de EROs (JAKUPEC; KEPPLER, 2004).

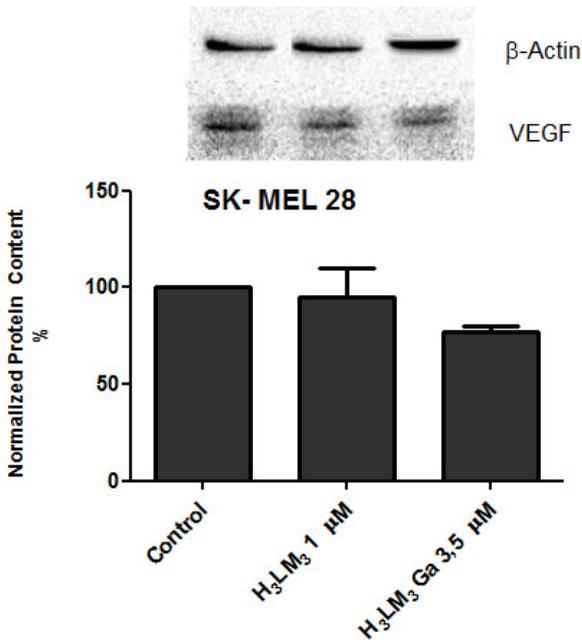
### **5.1.8 Avaliação da Proteína VEGF por imunoeletroforese**

Visto anteriormente que os compostos aqui analisados não apresentaram atividade citotóxica para a linhagem celular endotelial HUVEC, e que os compostos apresentaram ação antiangiogênica (em maior percentual o complexo mononuclear  $H_3LM_3 Ga$ ) no ensaio da membrana corialantóica, mudanças na quantidade da proteína fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) foram avaliadas nas linhagens celulares tumorais utilizadas neste estudo, uma vez aquelas linhagens apresentam o gene para esse fator.

Os resultados obtidos em relação à avaliação da quantidade de VEGF estão apresentados nas Figuras 23 e 24.

O VEGF tem sido considerado um agente quimiotático crucial na angiogênese, sendo identificado como um fator chave no desenvolvimento de muitos tumores. Neste estudo, a quantidade de VEGF foi avaliada pela metodologia de *Western Blotting*, em duas linhagens de melanoma humano SK-MEL 28 e SK-MEL 147, utilizando os valores de  $CC_{50}$  pré-determinados nos ensaios de citotoxicidade. (HANAHAN; FOLKMAN, 1996)

Figura 23 - Proteína VEGF em linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 28.



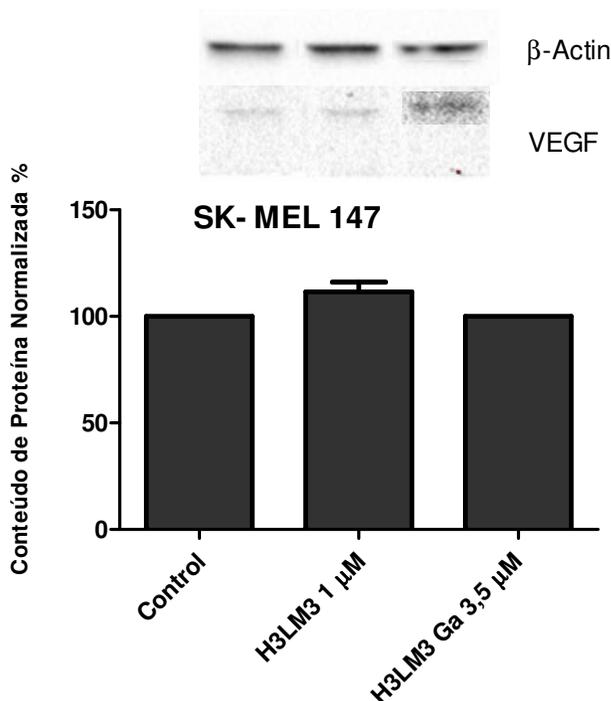
A análise foi por *Western blot* utilizando anticorpos monoclonais anti - VEGF e anti -  $\beta$  - actina após 24 h.

Fonte: Elaboração Própria

Os resultados demonstram que o complexo mononuclear de  $H_3LM_3$  Ga sobre linhagem tumoral SK-MEL 28 apresentou a redução de aproximadamente 20% em comparação ao controle. Enquanto que com o ligante não-simétrico, não foi observado redução quando comparado ao controle.

Em relação a linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 147 tanto o ligante não-simétrico quanto o complexo mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$  não apresentaram redução na expressão de VEGF como mostra a figura 24.

Figura 24 – Proteína VEGF em linhagem tumoral de melanoma humano SK-MEL 147.



A análise foi por *Western blot* utilizando anticorpos monoclonais anti - VEGF e anti -  $\beta$  - actina após 24 h.

Fonte: Elaboração Própria

Em outro estudo, com um complexo de Ru(III), foi investigado se a expressão de VEGF e a fosforilação de tirosina de VEGF-2 (forma ativa do VEGF-2) em células que estariam modificadas. O complexo reduziu quase que completamente a expressão de VEGF-2 (LAI et al., 2015). No entanto, NAMI-A outro complexo, não mostrou efeito algum na expressão de VEGF e VEGF-2, sugerindo assim que outras vias podem estar envolvidas na atividade antiangiogênica de complexos organometálicos. Haja vista, pelo que foi observado neste trabalho, que

a parte orgânica da molécula deve ser a grande responsável pelos efeitos dos complexos.

Por outro lado, o aumento de VEGF por sua vez, pode consequentemente resultar na ativação de várias vias de ajuste, como AKT e ERK. Estudos tem mostrado que o bloqueio de AKT e ERK1 poderia levar a inibição da angiogênese (LAI et al., 2015).

Contudo sugere-se que o complexo mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$ , pode ser um possível inibidor das vias AKT e ERK, visto que induziu a redução da expressão de VEGF em linhagem de melanoma humano SK-MEL 28, no entanto estudos adicionais necessitam ser realizados para a elucidação do mecanismo de ação molecular dos compostos aqui estudados.

## 6. RESUMO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos até o momento permitem concluir que:

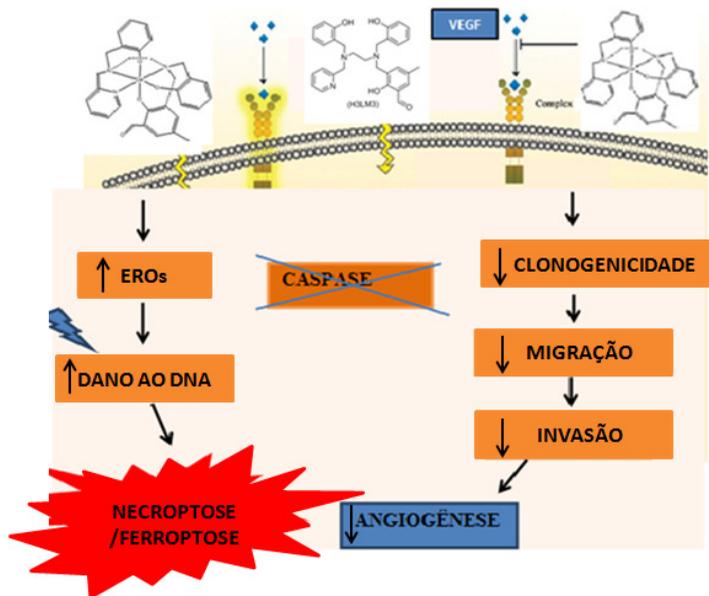
- Ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e o complexo mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$  são mais citotóxicos quando comparados com o nitrato de gálio (III), para as linhagens SK-MEL 28. E ainda o ligante e o complexo são tão ativos quanto o quimioterápico de referência vemurafenibe.
- Todos os compostos também mostraram-se citotóxicos, o ligante não-simétrico  $H_3LM_3$  e o complexo mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$  são mais citotóxicos quando comparados com o nitrato de gálio (III) frente a linhagem tumoral de melanoma SK-MEL 147.
- O ligante não-simétrico  $H_3LM_3$ , o complexo mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$  e o nitrato de gálio (III) não são citotóxicos quando expostos em linhagem não tumoral imortalizada de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC).
- Nas linhagens tumorais de melanoma humano SK-MEL 28 e SK-MEL 147, os compostos provavelmente induziram a morte celular por necroptose e/ou ferroptose.
- O complexo mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$  inibiu de forma significativa a invasividade das células SK-MEL 28 e SK-MEL 147.
- O ligante e o complexo diminuíram a capacidade das células formarem colônias.
- Os compostos apresentaram importante atividade antimetastática, ao inibir a proliferação, bem como ao bloquear a angiogênese de forma dependente de dose e de tempo.
- O mecanismo da atividade antitumoral do ligante e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$  está associado a indução de estresse oxidativo;
- O efeito citotóxico e antiproliferativo do ligante e do complexo mononuclear de  $H_3LM_3 Ga$  não está associado a ativação das caspases-3, 8, 9 e 12;

## 7. CONCLUSÃO

Neste estudo deu-se o primeiro passo nas pesquisas com dois compostos inéditos: o ligante não-simétrico e o complexo mononuclear de Ga, em que pode-se observar o potencial do complexado quando comparado ao ligante. Neste sentido, conclui-se que o conjunto de atividades antitumorais pesquisadas no presente estudo demonstrou claramente o potencial dos compostos. No entanto para precisar os respectivos mecanismos de ação constata-se a necessidade de mais investigações, embora alguns caminhos já tenham sido desvendados, conforme expomos na figura abaixo (Figura 25).

Com isso novas perspectivas surgem através de ligantes e seus complexados metálicos para o tratamento do câncer.

Figura 25 - Hipótese do mecanismo de ação antitumoral dos compostos pesquisados neste estudo.



Possível mecanismo de ação antitumoral desencadeado pelo ligante não simétrico H<sub>3</sub>LM<sub>3</sub> e pelo complexo mononuclear de Ga em linhagens tumorais de melanoma.

Fonte: adaptado LAI et al. (2015).

## REFERÊNCIAS

- AJITH, T.; JANARDHANAN, K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinusrimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 157–162, 2003.
- ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 4ª Ed. Porto Alegre (RS): Artes Médicas, 2004.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular Apoptosis Cell Death: biochemistry and molecular aspects. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37–58, 2007.
- ANDERSON, C. J.; WELCH, M. J. Radiometal labeled agents (non-technetium) for diagnostic imaging. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2219-2234, 1999.
- BABA, A. I.; CÂTOI, C. **Comparative Oncology**. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, 2007. 150 p.
- BAI, R. Z. et al. Suppression of lung cancer in murine model: treated by combination of recombinant human endostatin adenovirus with low-dose cisplatin. **Journal of experimental & clinical cancer research**, v. 28, p. 31, 2009.
- BALCH, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199–206, 2009.
- BALOGH, et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86, n.4, p.732-742, 2011.
- BANDOLI, A, et al. Bioorthogonal chemistry for <sup>68</sup>Ga radiolabelling of DOTA-containing compounds. **Coord. Chem. Rev.**, v.253, 56-77, 2009.

BARTKOVA, J. et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 633–637, 2006.

BERALDO, H. Contribuições da Química Inorgânica para a Química Medicinal. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 6, p. 4-6, 2005.

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

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M. et al. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nature reviews. **Molecular cell biology**, v. 8, n. 9, p. 729–740, 2007.

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

CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 50, p. 63–70, 2000.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563–72, 2002.

CHEN, M. C. et al. The role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in lymphotoxin- beta receptor-mediated cell death. **J BiolChem**, v. 278, p. 16073-1601, 2003.

CHERAGHI, O. et al. Potent anti-angiogenic and cytotoxic effect of conferone on human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. **Phytomedicine**, v. 23, n. 4, p. 398–405, 2016.

CHIU, J.; DAWES, I. W. Redox control of cell proliferation. **Trends in Cell Biology**, v. 22, n. 11, p. 592–601, 2012.

CHO Y.S. et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. **Cell**, v. 137, p.1112-11123, 2009.

- CHUA, M.S. et al. Gallium maltolate is a promising chemotherapeutic agent for the treatment of hepatocellular carcinoma. **Anticancer research**, v. 26, n. 3A, p. 1739–43, 2006.
- COTTER, T.G , et al. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nat Rev Cancer**. v. 9, n. 7, p. 501-7, 2009.
- DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–954, 2002.
- DIAZ-MORALLI, S. et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, v. 138, n. 2, p. 255–71, 2013.
- DIXON, S.J.; LEMBERG, K.M.; LAMPRECHT, M.R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, p. 1060-1072, 2012.
- DOLMA, S. et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. **Cancer Cell**, v. 3, p. 285–296, 2003.
- DUFFY, M. J. The war on cancer: are we winning? **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 34, n. 3, p. 1275–84, 2013.
- DUNAI, Z.; BAUER, P.I.; MIHALIK, R. Necroptosis: Biochemical, Physiological and Pathological Aspects. **Pathol. Oncol. Res.**, v.17, 2011.
- EGGERMONT, A. M. M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816–27, 2014.
- FAUBION, W.A; GORES, G.J. Death receptors in liver biology and pathobiology. **Hepatology**. v. 29, p.1-4, 1999.
- FAVALORO, B. et al. Role of apoptosis in disease. **Ageing**, v. 4, n. 5, p. 330–349, 2012.
- FERREIRA, F.R; NASCIMENTO, L.F.C. Mortality due to cutaneous melanoma in south region of Brazil: a spatial approach. **An Bras Dermatol**. v. 91, n. 4, p. 437-441, 2016.
- FIANDALO, M. V; KYPRIANOU, N. Caspase control: Protagonists of cancer cell apoptosis. **Experimental Oncology**, 2012.
- FIANDALO, M.V; KYPRIANOU, N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. **Exp Oncol**. v. 34, n. 3, p. 165 a 175, 2012.

FIDLER, I. J. Critical determinants of metastasis. **Seminars in cancer biology**, v. 12, n. 2, p. 89–96, 2002.

FOLETTTO, M.C, HAAS, S.E. Cutaneous melanoma: new advance in treatment. **In: Anais Brasileiros de Demartologia**. v. 89, n. 2, Rio de Janeiro, 2014.

FONSECA, A. S. **Síntese, caracterização e avaliação de citotoxicidade de novos ligantes não-simétricos e seus complexos mononucleares, homo e heterobinucleares**. 2014. 230 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências Físicas e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis. 2014.

FRANKEN, N.A.P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

FRANZON, V.A.P. et al. Melanoma: perfil epidemiológico de cinco anos em um hospital de curitiba-pr. **Revista da UFPR Catálogo de Medicina**.v. 2, n. 2 (2015).

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications: sixth edition. **In: Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2010. p. 317–334.

FRIEDL, P. et al. Classifying collective cancer cell invasion. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 777–783, 2012.

FRIEDL, P.; HEGERFELDT, Y.; TUSCH, M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. **International Journal of Developmental Biology**, 2004.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. FADD: an endogenous inhibitor of RIP3-driven regulated necrosis. **Cell Research**, v. 21, n. 10, p. 1383–1385, 2011.

GAMBINO, D. et al. Searching for gallium bioactive compounds: Gallium(III) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazone derivatives **Polyhedron**, v. 30, p. 1360–1366, 2011.

GREEN, D.R.; VICTOR, B. The pantheon of the fallen: why are there so many forms of cell death? **Trends Cell Biol**, v. 22, p. 555–556, 2012.

GUNN, G. **Critical Metals Handbook**. [s.l.] Wiley, 2014.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353–364, 1996.

HANNON, M. J. Metal-based anticancer drugs: From a past anchored in platinum chemistry to a post-genomic future of diverse chemistry and biology. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 2243–2261, 2007.

HARRIS, W. R.; MESSORI, L. A comparative study of aluminum(III), gallium(III), indium(III), and thallium(III) binding to human serum transferrin. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 228, n. 2, p. 237–262, 2002.

HEJMADI, M. **Introduction to Cancer Biology**. [s.l: s.n.].

HENRIQUEZ, M. et al. Cell death by necrosis, a regulated way to go. **Current molecular medicine**, v. 8, p. 187–206, 2008.

HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 90–97, 2013.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19ª Ed. São Paulo: Manole, 1999, p.1552.

HUMMER, A. A. et al. X-ray absorption spectroscopy of an investigational anticancer gallium(III) drug: Interaction with serum proteins, elemental distribution pattern, and coordination of the compound in tissue. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5601–5613, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.html>> Acesso em maio de 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

IRANZO, C. C. et al. Malignant and premalignant skin lesions: knowledge, habits and sun protection campaign. **Acta paul. enferm.** v.28, n.1, 2015

JAKUPEC, M. A.; KEPPLER, B. K. Gallium in Cancer Treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 15, p. 1575-1583, 2004.

KAISER W. J. et al. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. **Nature**, v. 471, p. 368- 372, 2011.

KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012.

KIM, Chung Kwon; et al. Akt attenuates apoptotic death through phosphorylation of H2A under hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells and hippocampal neurons. **Nature**. 2016.

LABROUSSE, A. L. et al. Stromal reaction in cutaneous melanoma. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 49, p. 269–275, 2004.

LAI, H. et al. Antiangiogenic ruthenium benzimidazole complexes, structure-based activation of distinct signaling pathways. **Metallomics**, v. 7, n. 3, p. 439–447, 2015.

LAUX, I.; NEL, A. Evidence that oxidative stress-induced apoptosis by menadione involves Fas-dependent and Fas-independent pathways. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 101, n. 3, p. 335–44, 2001.

LEE, J.-H.; CHOI, J.-W.; KIM, Y.-S. Frequencies of BRAF and NRAS çlpo0mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. **British Journal of Dermatology**, v. 164, n. 4, p. 776–784, 21 abr. 2011.

LINKERMANN, A. et al. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. **Proc Natl Acad Sci**. v. 111, n. 47, 2010.

LIU, D. P.; SONG, H.; XU, Y.A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability. **Oncogene**, v. 29, n. 7, p. 949–956, 2010.

LIU, H. et al. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/prognosis marker. **Int J Biochem Mol Biol**, v. 1, p. 69-89, 2010.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. Cell death in health and disease. **J Cell Mol Med**, v. 11, n. 6, p. 1214-1224, 2007.

LÖFFEK, S. et al. Melanoma cell-derived vascular endothelial growth factor induces endothelial tubulogenesis within fibrin gels by a metalloproteinase-mediated mechanism. **European journal of cell biology**, v. 85, n. 11, p. 1167–77, 2006.

LORENZO, G. Necrosis: Linking the Inflammasome to Inflammation. **Cell Cycle**. v. 11, n. 10, p. 1501-1502, 2015.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.

MCCALL, K. Genetic control of necrosis-another type of programmed cell death. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 6, p. 882–888, 2010.

MICHAEL A.; JAKUPEC, B. S. P.; BERNHARD K. KEPLER, B. S. P. Gallium in Cancer Treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 15, p. 1575–1583, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic cell survival assay. **Methods in molecular medicine**, v. 110, p. 21–28, 2005.

NGUYEN, M.; SHING, Y.; FOLKMAN, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Microvascular research**, v. 47, n. 1, p. 31–40, 1994.

NISHIO, K. et al. Senescence and cytoskeleton: Overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 116, n. 4, p. 321–327, 2001.

OCTAVIA, Y. et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 6, p. 1213–1225, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), **Câncer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: maio de 2015.

PEJKOVA, S; DZOKIC, G; PANOV, S. Molecular Biology and Genetic Mechanisms in the Progression of the Malignant Skin

Melanoma. **Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)**, v. 1, n. 2-3, p. 89-97, 2016.

RAFEHI, H. et al. Clonogenic Assay: Adherent Cells. **Journal of Visualized Experiments**, n. 49, p. 15–17, 2011.

ROSEN, A. C. et al. Impact of dermatologic adverse events on quality of life in 283 cancer patients: a questionnaire study in a dermatology referral clinic. **American journal of clinical dermatology**, v. 14, n. 4, p. 327–33, ago. 2013.

ROSENBERG, B. Biological effects of platinum compounds. New agents for the control of tumors. **Platinum Metals Review**, v. 15, n. 2, p. 42, 1971.

ROSENBERG, B.; AL, E. Platinum Cmpounds: a new Class of Potent Antitumour Agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385, 1969.

SIMÕES, V. N. et al. Synthesis, characterization and study of the properties of a new mononuclear quercetin complex containing Ga(III) ions. **Quim. Nova**. Vol. 36, No. 4, 495-501, 2013.

SOUZA, R.J.S; CORREA, M.P; REZENDE, M.L. An estimate of the cost of treating non-melanoma skin cancer in the state of São Paulo, Brazil. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 4, p. 657-662, 2011.

STEEG, P. S.; THEODORESCU, D. Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nature clinical practice*. **Oncology**, v. 5, n. 4, p. 206–219, 2008.

STOCKWELL, B. R. et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. **Molecular Plant**. v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 2012.

TERRA, G. G. Novos complexos mononucleares de GaIII e InIII com ligantes não-simétricos: potenciais agentes quimioterápicos e radiofármacos. 2012. 46 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2012.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Boon and bane of metal ions in medicine. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 936-939, 2003.

TIMERBAEV, A. R. Advances in developing tris(8-quinolinolato)gallium(iii) as an anticancer drug: critical appraisal and prospects. **Metallomics : integrated biometal science**, v. 1, n. 3, p. 193–8, 2009.

- TSUCHIHARA, K.; FUJII, S.; ESUMI, H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. **Cancer letters**, v. 278, n. 2, p. 130–8, 18 jun. 2009.
- TUONG, W; CHENG, LS; ARMSTRONG, AW. Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. **Dermatol Clin.** v. 30, n. 1, p. 113-124, 2012.
- VANDEN BERGHE, T. et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell Death Differ**, v. 17, p. 922-930, 2010.
- VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, p. 700-14, 2010.
- VANLANGENAKKER, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 75–86, 2012.
- VANTIEGHEM A. et al. P. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. **FEBS Lett**, v. 440, p. 19-24, 1998.
- VERFAILLIE, A. et al. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. **Nature communications**, v. 6, p. 6683, 9 jan. 2015.
- VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 167–190, 2000.
- VERRAX, J. et al. Intracellular ATP levels determine cell death fate of cancer cells exposed to both standard and redox chemotherapeutic agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 11, p. 1540–1548, 2011.
- VIEIRA, R.J.D. **Oncogénese e progressão do Melanoma: Análise mutacional e estudo clínico retrospectivo**. 2013. 270 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra. 2013.
- WANGARI-TALBOT, J; CHEN, S. Genetics of melanoma. **Front Genet.** v. 25, n. 3, 2013.

WEIS, S. M.; CHERESH, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1359–1370, 2011.

WELLBROCK, C.; HURLSTONE, A. BRAF as therapeutic target in melanoma. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 561–567, 2010.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **Journal of Pathology**, v. 226, p. 352–364, 2012.

YANG, W.S.; SRIRAMARATNAM, R.; WELSCH, M.E. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. **Cell**, v. 156, p. 317–331, 2014.

YUAN, Junying. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. **Curr Opin Cell Biol**. v. 22, n.2, p. 263–268, 2010.

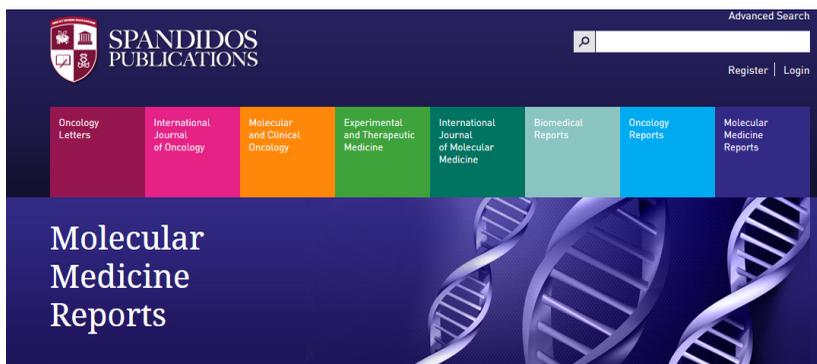
ZAIDI, M. R.; DAY, C.-P.; MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. May, p. 2381–2391, 2008.

ZHANG, H. et al. Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes. **Nature**, v. 471, p. 373–376, 2011.

ZHOU, S. et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? **Cancer Letters**, 2012.

## ANEXOS

ANEXO A- primeira página do artigo publicado no periódico *Molecular Medicine Reports*, sob o título: Substituted 3-acyl-2-phenylamino-1,4-naphthoquinones intercalate into DNA and cause genotoxicity through the increased generation of reactive oxygen species culminating in cell death.



## Substituted 3-acyl-2-phenylamino-1,4-naphthoquinones intercalate into DNA and cause genotoxicity through the increased generation of reactive oxygen species culminating in cell death

---

**Authors:** Mirelle Sifroni Farias, Claus Tröger Pich, Maicon Roberto Kwiecinski, Nádia Cristina Falcão Bucker, Karina Bettega Felipe, Fabiana Ourique Da Silva, Tânia Mara Fisher Günther, João Francisco Correia, David Ríos, Julio Benites, Jaime A. Valderrama, Pedro Buc Calderon, ✉Rozangela Curi Pedrosa

**Corresponding author:** Rozangela Curi Pedrosa [ roza@ccb.ufsc.br ]

[View Affiliations](#)

**Published online on:** Wednesday, April 16, 2014

**Pages:** 405-410 **DOI:** 10.3892/mmr.2014.2160

ANEXO B- primeira página do artigo publicado no Journal of Ethnopharmacology, sob o título: Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Caseariasyvestris* (Salicaceae)



Research Paper

## Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae)

Karina Bettega Felipe<sup>a</sup>, Maicon Roberto Kwiecinski<sup>a, b</sup>, Fabiana Ourique da Silva<sup>a</sup>, Nádia Falcão Bucker<sup>a</sup>, Mirelle Sinfroni Farias<sup>a</sup>, Luiza Sheyla Evenni Porfírio Will Castro<sup>a</sup>, Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius<sup>a</sup>, Nadia Sandrini Motta<sup>a</sup>, João Francisco Gomes Correia<sup>a</sup>, Maria Helena Rossi<sup>c</sup>, Rozangela Curi Pedrosa<sup>a</sup>  

[+ Show more](#)

doi:10.1016/j.jep.2014.07.040

[Get rights and content](#)