



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**Avaliação do potencial anticâncer do derivado benzotiazólico (*E*)-2-
((2-(benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol em células de
melanoma humano**

ZANAIR SOARES VASCONCELOS

MANAUS

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

ZANAIR SOARES VASCONCELOS

**Avaliação do potencial anticâncer do derivado benzotiazólico (*E*)-2-
((2-(benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol em células de
melanoma humano**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

MANAUS

2013

ZANAIR SOARES VASCONCELOS

**Avaliação do potencial anticâncer do derivado benzotiazólico (E)-2-
((2-(benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol em células de
melanoma humano**

Dissertação aprovada em ____ de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Orientadora
Universidade Federal do Amazonas**

**Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno
Membro
Universidade Federal do Pará**

**Profa. Dra. Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira
Membro
Universidade Federal do Amazonas**

Ao senhor Air e senhora Zânia, meus pais,
pois sempre que o mundo me disse não, eles
disseram sim pro meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde;

Ao Exército Brasileiro, pela experiência de vivenciar a Amazônia;

Ao Excelentíssimo Senhor General de Divisão Guilherme Cals Theophilo Gaspar de Oliveira, pelo apoio e confiança, sem os quais não seria possível este trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade;

A CAPES, pelo financiamento do projeto;

A Professora Doutora Marne Carvalho de Vasconcellos, pela amizade, dedicação, confiança e principalmente paciência;

Ao Doutor Jonilson Vieira De Castro, Doutora Patrícia Antônia Bezerra, Doutora Ana Regina Ferreira de Souza, Doutora Elizabeth Alencar Vieira e Doutora Tânia Gonzalez, pela apoio inestimável e amizade sincera;

Ao Hospital Adventista de Manaus pela liberação, confiança e apoio;

A Doutora Gleyce dos Santos Barbosa, Doutora Tatiane Pedrosa dos Santos, Doutora Ana Carolina Lima Ralph e Doutora Elenn Suzany Pereira Aranha pela amizade, caminhada compartilhada e carinho dividido;

A todos que com carinho me desejaram sucesso.

Nada pode parar a inexorável marcha do tempo.

Autor desconhecido

Ele era mais um entre mil mas eu lhe transformei em amigo e isso fez dele único.

Saint-Exupéry

RESUMO

O melanoma maligno é um dos poucos cânceres que vem aumentando em prevalência, bem como taxa de mortalidade em todo o mundo. Afeta principalmente populações brancas, no entanto, todos os grupos étnicos são afetados em alguma proporção. Os avanços na compreensão das causas, progressão e, em particular, dos genes que afetam o desenvolvimento do câncer possibilitam melhorias nas ferramentas para a detecção e tratamento câncer, no entanto, apesar dos avanços significativos na compreensão da biologia do melanoma e das abordagens para tratar a doença em estágio avançado agora se voltarem para inibidores de genes envolvidos nessa doença, houve poucas mudanças aprovadas nas terapias utilizadas. Assim, o melanoma maligno vem sendo intensamente investigado devido ao seu elevado potencial metastático. Muitos pacientes, ao serem diagnosticados com melanoma já tem metástases, o que é a principal causa de morte entre eles. Este tipo de tumor é quase insensível ao regime padrão de quimioterapia, e os agentes quimioterapêuticos disponíveis são limitados. Algumas mutações são conhecidas nos melanomas cutâneos como *N-Ras*, *Tp16* e *Tp53*, entretanto, mutações em *B-Raf* excedem significativamente a frequência de outras mutações (40-50%). Nesse contexto, tratamentos mais eficazes são necessários e na constante busca por novos compostos, os derivados benzotiazólicos mostram-se como uma importante alternativa, já que tem sido apontados como possíveis agentes antitumorais. Nesse sentido, este projeto explorou os possíveis mecanismos de ação do derivado benzotiazólico (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol sobre a viabilidade celular, a atividade clonogênica, a motilidade e a capacidade invasiva em linhagens celulares de melanoma SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-103 que possuem diferentes características de mutações nos genes responsáveis pelo controle da homeostasia celular, como *Tp53* e *B-Raf*. Os resultados dos ensaios executados revelaram um CI50 em 72 horas entre (4,87 e >10 µM) e uma possível toxicidade seletiva para o gene *B-Raf* mutado. Outros testes evidenciaram indução de morte celular por apoptose, diminuição da motilidade e da capacidade invasiva das células SK-Mel tratadas com derivado benzotiazólico (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol. Os resultados obtidos tornam este composto alvo de mais pesquisas para sua utilização contra o câncer.

Palavras-chave: Câncer de pele, *B-Raf*, Benzotiazóis.

ABSTRACT

Malignant melanoma is one of the few cancers has been increasing in prevalence and mortality worldwide. It affects mainly white populations, however, all ethnic groups are affected to some extent. Increased understanding of the causes, progression, and in particular, genes that affect the development of cancer enable improvements in tools for detecting and treating cancer, however, despite significant advances in understanding the biology of melanoma, no changes in practices involved in both approaches and therapies to treat advanced disease. Thus, malignant melanoma has been intensively investigated due to its high metastatic potential. Many patients, when diagnosed with metastatic melanoma have already, which is the leading cause of death among them. This tumor is almost insensitive to standard regimens of chemotherapy, and the chemotherapeutic agents available are limited. Some mutations are known in cutaneous melanomas and *N-Ras*, *Tp16* and *Tp53*, however, changes in B-Raf significantly exceed the frequency of the other mutations (40-50%). In this context, this project explored the possible mechanisms of action of the derivative benzotiazólico (*E*)-2-((2-(Benzo[d]thiazole-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol on cell viability, the activity clonogénica, motilidad and invasiveness in melanoma cell lines SK-Mel-19, SK-Mel-28 and SK-Mel-103 that have different characteristics from mutations in the genes responsible for the control of cellular homeostasis, as *Tp53* and *B-Raf*. The results of tests performed showed an IC50 at 72hours between (4.87and>10 μ m) and a possible selective toxicidad to the gene mutated *B-Raf*. Other tests showed induction of cell death by apoptosis, impaired motility and invasiveness of cells treated with SK-Mel benzotiazólico derivative (*E*)-2-((2-(Benzo[d]thiazole-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol. The obtained results make this target compound for more research to use against cancer.

Keywords: Cutaneous melanoma, *B-Raf*, Benzothiazoles.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Características do Câncer. As seis primeiras características funcionais do câncer são mantidas por mais duas características funcionais descobertas recentemente e duas características não funcionais que possibilitam a existência do tumor. Adaptado de: HANAHAN; WEINBERG, 2011.21
- Figura 2 – Tipos de tumores. Em um tumor benigno células mutantes permanecem contido dentro de um único agrupamento, com um limite claro separando-os a partir de células normais. Em um tumor maligno, as células mutantes são misturados com as células normais, a tentativa de invadir o tecido circundante. As células ao centro na cor violeta mostram um núcleo neoplásico senescente. As células na cor azul demonstram a camada neoplásica em fase proliferativa. As células na cor verde demonstram o tecido normal adjacente ao tumor.22
- Figura 3 – Desenho esquemático mostrando as etapas da progressão do melanoma humano e as alterações moleculares associadas com a iniciação e progressão tumoral.28
- Figura 4 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma maligno da pele por 100 mil homens e 100 mil mulheres estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação.29
- Figura 5 – Representação da localização do gene *Tp53* no cromossomo 17.34
- Figura 6 – Representação da localização do gene *B-Raf* no cromossomo 7.37
- Figura 7 – Vias de sinalização frequentemente desreguladas em melanomas. Interações entre as principais vias de sinalização envolvidas no surgimento e progressão do melanoma. O receptor tipo tirosina quinase (RTK) transmite o sinal extracelular para *Ras*, que na sua forma ligada por GTP ativa as vias *Raf/MEK/ERK* ou *PI(3)K/Akt/mTOR*; *MDM2*, (mouse double minute protein 2) liga a *p53* e o conduz para a ubiquitinação e destruição no proteossomo.39
- Figura 8 – Visão geral da via de sinalização *Ras/Raf/MEK/ERK*. Após a ligação de fatores de crescimento (GF) a receptores tirosina-quinase (RTK), *Ras* é ativada na membrana plasmática via *GRB2* e *SOS*. *Ras* ativado recruta *Raf* para a membrana plasmática, por sua vez torna-se ativada. *Raf* fosforila e ativa *MEK*, que por sua vez fosforila e ativa a *ERK*. *ERK* ativado medeia várias respostas celulares, tais como a proliferação, a sobrevivência e a diferenciação celulares.40
- Figura 9 – Drogas aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento do melanoma.43
- Figura 10 – Via de sinalização *MAPK* e alvos de atuação de drogas antimelanoma.45
- Figura 11 – Estrutura química da classe Benzotiazol. O anel heterocíclico (com átomo de enxofre (S) e nitrogênio (N)) e o anel tiazol.47
- Figura 12 – Delineamento experimental.51
- Figura 13 – Estrutura do (E)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol, derivado (E)-2-Benzotiazol Hidrazona52
- Figura 14 – Diferentes graus de dano no DNA avaliados pelo teste do cometa: a) Grau 0; b) Grau 1; c) Grau 2; d) Grau 3; e) Grau 4; f) Célula apoptótica.60
- Figura 15 – Análise de viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripan – Quantificação de morte celular pela AFN01 (1,0; 2,5 e 5,0 μM) na linhagem celular de melanoma humano metastático SK-MEL-19 após incubação de 24 h (a), 48 h (b) ou 72 h (c). DMSO 0,1% foi usado como controle negativo.

Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μ M). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados (n=6). *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.	68
Figura 16 – Análise de viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán – Quantificação de morte celular pela AFN01 (1,0; 2,5 e 5,0 μ M) na linhagem celular de melanoma humano metastático SK-MEL-28 após incubação de 24 h (a), 48 h (b) ou 72 h (c). DMSO 0,1% foi usado como controle negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μ M). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados (n=6). *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.	69
Figura 17 – Análise de viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán – Quantificação de morte celular pela AFN01 (1,0; 2,5 e 5,0 μ M) na linhagem celular de melanoma humano metastático SK-MEL-103 após incubação de 24 h (a), 48 h (b) ou 72 h (c). DMSO 0,1% foi usado como controle negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μ M). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados (n=6). *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.	70
Figura 18 – Ensaio Clonogênico mostrando os efeitos em sete (07) dias do tratamento com AFN01 sobre células de câncer de pele melanoma. a) e b) Células SK-Mel-19 tratadas com DMSO, doxorrubicina, dacarbazina ou AFN01 por um período de 168 h; c) e d) Células SK-Mel-28 tratadas com DMSO, doxorrubicina, dacarbazina ou AFN01 por um período de 168h; e, e) e f) Células SK-Mel-103 tratadas com DMSO, doxorrubicina, dacarbazina ou AFN01 por um período de 168h. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). **p<0,01, *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.	72
Figura 19 – Determinação da viabilidade das células pelo laranja de acridina e brometo de etídio (LA / BE) coloração de células SK-MEL-19 tratadas com AFN01 usando microscopia de fluorescência. DMSO foi usado como controle negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μ M). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em duplicata (n = 6). **p<0,001, *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Bonferroni.	74
Figura 20 – Determinação da viabilidade das células pelo laranja de acridina e brometo de etídio (LA / BE) coloração de células SK-MEL-28 tratadas com AFN01 usando microscopia de fluorescência. DMSO foi usado como controle negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μ M). Os dados são apresentados como média \pm desvio de padrão de três experimentos independentes em duplicata (n = 6). **p<0,001, *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Bonferroni.	75
Figura 21 – Determinação da viabilidade das células pelo laranja de acridina e brometo de etídio (LA / BE) coloração de células SK-MEL-103 tratadas com AFN01 usando microscopia de fluorescência. DMSO foi usado como controle negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μ M). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em duplicata (n = 6). **p<0,001, *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Bonferroni.	76

- Figura 22 – Ensaio de Avaliação Morfológica Hematoxilina / Eosina – SK- Mel – 19. Ensaio de Avaliação Morfológica Hematoxilina / Eosina – SK- Mel – 19. Núcleos basofílicos (a), com pontos de condensação de cromatina (b), nucléolos (c), citoplasma basofílico e finamente granular (d), lise celular (e) intensa lise citoplasmática representado por pequenas vesículas que se desprendem (e), halos perinucleares (f), vacúolos citoplasmáticos (g), anfília nuclear (h), afrouxamento da cromatina (i) e anfília citoplasmática (j), citoplasma granular (k), basofília citoplasmática (l).....78
- Figura 23 – Ensaio de Avaliação Morfológica Hematoxilina / Eosina – SK- Mel – 28. Citoplasma basofílico (a), vacúolos (b), núcleo basofílico com cromatina densa e pontos de condensação (c), cromatina menos densa (d), lise do citoplasma representado por pequenas vesículas que se desprendem (e), lise acentuada (f), cromatina frouxa (g), cariólise (h), intensa lise celular (e), nucléolos (i), aumento da basofília nuclear (j), lise celular (e), vacúolos citoplasmáticos (k), halos perinucleares (l) cariorrexi (m).79
- Figura 24 – Ensaio de Avaliação Morfológica Hematoxilina / Eosina – SK- Mel – 103. Núcleos basofílicos (a), condensação de cromatina (b), nucléolos (c), citoplasma basofílico e finamente granular (e), lise do citoplasma representado por pequenas vesículas que se desprendem (f), halos perinucleares (g) e vacúolos citoplasmáticos (h), afrouxamento da cromatina (i).....80
- Figura 25 – Teste do Cometa em pH Neutro mostrando os efeitos da AFN01 sobre a fita de DNA. A droga tem efeito concentração dependente nas quebras duplas (a, c, e). Todas as concentrações testadas resultaram em quebras duplas na fita de DNA de mais de 95% das células (b, d, f). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). *** $p < 0,001$ comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.82
- Figura 26 – Teste do Cometa em pH Alcalino mostrando os efeitos da AFN01 sobre a fita de DNA. A droga tem efeito concentração dependente nas quebras simples e duplas da fita de DNA (a, c, e). Todas as concentrações testadas resultaram em quebras simples e duplas na fita de DNA de mais de 95% das células (b, d, f). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). *** $p < 0,001$ comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.83
- Figura 27 – AFN01 suprime a motilidade e migração em células SK-Mel-19 tratadas por 24 h. As fotos mostram a aparência microscópica dos processos de cicatrização de feridas do controle de células tratadas com AFN01 1,0, 2,5 e 5,0 μM por 0, 24, 48 e 72 h. SK-Mel-19. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas a 80% de confluência. Depois de gerar um “arranhão” na monocamada, as células foram incubadas com AFN01, DMSO, dacarbazina e doxorubicina. As fotos foram tiradas imediatamente após o ferimento (0 hora) e nos tempos de 24, 48 e 72 h com ampliação de 100 X e escala em μm . No tempo de 72h (1) indica diâmetro inicial e (2) diâmetro final mensurado. A mensuração do espaço entre os filmes celulares foi feito pelo Software de aquisição de imagens LAS EZ.86
- Figura 28 – AFN01 suprime a motilidade e migração em células SK-Mel-28 tratadas por 24 h. As fotos mostram a aparência microscópica dos processos de cicatrização de feridas do controle de células tratadas com AFN01 1,0, 2,5 e 5,0 μM por 0, 24, 48 e 72 h. SK-Mel-28. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas a 80% de confluência. Depois de gerar um “arranhão” na monocamada, as células foram incubadas com AFN01, DMSO, dacarbazina e

doxorubicina. As fotos foram tiradas imediatamente após o ferimento (0 hora) e nos tempos de 24, 48 e 72 h com ampliação de 100 X e escala em μm . No tempo de 72h (1) indica diâmetro inicial e (2) diâmetro final mensurado. A mensuração do espaço entre os filmes celulares foi feito pelo Software de aquisição de imagens LAS EZ.87

Figura 29 – AFN01 suprime a motilidade e migração em células SK-Mel-103 tratadas por 24 h. As fotos mostram a aparência microscópica dos processos de cicatrização de feridas do controle de células tratadas com AFN01 1,0, 2,5 e 5,0 μM por 0, 24, 48 e 72 h. SK-Mel-103. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas a 80% de confluência. Depois de gerar um “arranhão” na monocamada, as células foram incubadas com AFN01, DMSO, dacarbazina e doxorubicina. As fotos foram tiradas imediatamente após o ferimento (0 hora) e nos tempos de 24, 48 e 72 h com ampliação de 100 X e escala em μm . No tempo de 72h (1) indica diâmetro inicial e (2) diâmetro final mensurado. A mensuração do espaço entre os filmes celulares foi feito pelo Software de aquisição de imagens LAS EZ.88

Figura 30 – Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular *in vitro* – A capacidade de atravessar a membrana basal proporciona as células neoplásicas a possibilidade de invadir tecidos adjacentes. O ensaio de raspagem celular *in vitro* avalia o efeito inibitório da droga AFN01 sobre a migração das células SK – Mel 19, SK – Mel 28 e SK – Mel 103 em um plano horizontal sem obstáculos. A inibição da migração é observado nos quadros a, b e c, onde: 1-Controle; 2-AFN01 1,0 μM ; 3-AFN01 2,5 μM e 4-AFN01 5,0 μM . Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). **p<0,01, *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.89

Figura 31 – Migração Vertical em Câmara de Boyden – A motilidade é característica intrínseca de tumores malignos. No ensaio de migração vertical *in vitro*, que simula essa capacidade, a droga AFN01 inibiu a migração das células SK – Mel 19, SK – Mel 28 e SK – Mel 103, nos quadros **b**, **d** e **f** onde: 1-Controle; 2-AFN01 1,0 μM ; 3-AFN01 2,5 μM e 4-AFN01 5,0 μM . A ação concentração dependente é observado nos gráficos **a** e **c**. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). **p<0,01, *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.91

Figura 32 – Ensaio de Invasão em Câmara de Boyden – A capacidade de atravessar a membrana basal proporciona as células neoplásicas a possibilidade de invadir tecidos adjacentes. No ensaio de invasão *in vitro*, que simula essa capacidade, a droga AFN01 inibiu a invasão das células SK – Mel 19, SK – Mel 28 e SK – Mel 103, nos quadros **b**, **d** e **f** onde: 1-Controle; 2-AFN01 1,0 μM ; 3-AFN01 2,5 μM e 4-AFN01 5,0 μM . A ação concentração dependente é observado nos gráficos **a**, **c** e **e**. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). *** p<0,001 e ****p<0,0001, comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – TMN – Classificação Clínica do Melanoma	24
Tabela 2 - Resumo dos Grupos de Estadiamento.....	27
Tabela 3 – Variedades de Melanoma.....	31
Tabela 4 - Atividades Biológicas de derivados Benzotiazólicos	48
Tabela 5 – Linhagens de melanoma metastático humano que serão utilizadas no projeto.	53
Tabela 6 – CI50 em μM de AFN01, dacabazina e doxorubicina em células de melanoma metastático humano por Alamar Blue.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	American Cancer Society
AhR	Aryl hydrocarbon receptor; Receptor hidrocarboneto de arila
AKT	Protein kinase B; Fator antiapoptótico
cAMP	3',5'- Monofosfato de Adenosina cíclico, AMP cíclico;
CDKN2A	Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A
CPNM	Câncer de pele não-melanoma
CYP1A1	Isoforma do citocromo P450
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> ; meio de cultura de células;
ERK	Extracellular signal regulated kinase; Quinase regulada por sinal extracelular
GF	Growth factor; Fator de crescimento
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP3	Inositol (1,4,5)-trisfosphate, Inositol trifosfato
MAPK	Mitogen activated protein kinase; Proteína Cinase Ativada por Mitógenos
MDM2	<i>Mouse double minute protein 2</i> ; regulador negativo do supressor de tumor p53
MEK	Mitogen extracelular kinase; Quinase ativadora da MAP quinase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> ; Ácido ribonucléico mensageiro
NCI-USA	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
p14ARF	Promotor de apoptose após a ocorrência de danos ao DNA
p16INK4A	Inibidor de quinases dependentes de ciclinas – CDKs
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> ; fator de crescimento de plaquetas;
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i> ; Homólogo a fosfatase e angiotensina)
RAS	Rat sarcoma; Proteínas ligadoras de nucleotídeos de guanina;
RPG	Radial growth phase; Fase de crescimento epidérmico radial
RTK	Receptor tyrosinekinase; Receptor tipo tirosina quinase
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> ; PCR em tempo real
VPG	Vertical growth phase; fase de crescimento vertical
TNM	Tumor node metastasis; tumor linfonodo metástase
WT	Wilde type; tipo selvagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Câncer	19
2.2	Melanoma	26
2.3	<i>Tp53</i> e melanoma	33
2.4	<i>B-Raf</i> e melanoma	36
2.5	Tratamento do Melanoma	43
2.6	Compostos Benzotiazólicos	47
3	OBJETIVOS	50
3.1	Objetivo geral	50
3.2	Objetivos específicos	50
4	METODOLOGIAS	51
4.1	Delineamento Experimental	51
4.2	Objeto de estudo	52
4.3	Linhagens celulares	52
4.3.1	Manutenção das células	53
4.4	Avaliação da Citotoxicidade Celular	54
4.4.1	Ensaio do Alamar Blue	54
4.4.2	Exclusão por Azul de Tripán	55
4.5	Avaliação da sensibilidade celular	56
4.5.1	Ensaio clonogênico	56
4.6	Avaliação do tipo de morte celular	57
4.6.1	Coloração diferencial pelo Brometo de Etídio (BE)/Acridina Laranja (AO)	57
4.7	Análise morfológica	58
4.7.1	Coloração diferencial pela Hematoxilina/Eosina	58
4.8	Avaliação da genotoxicidade	59
4.8.1	Teste do Cometa	59
4.9	Avaliação da motilidade e invasão celular	62
4.9.1	Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular <i>in vitro</i>	62
4.9.2	Migração vertical, utilizando câmara de Boyden	63
4.9.3	Invasão em matrigel, utilizando câmara de Boyden	64
4.10	Análise estatística	65
5	RESULTADOS	66
5.1	Avaliação da Citotoxicidade Celular	66
5.1.1	Ensaio do Alamar Blue	66
5.1.2	Exclusão por Azul de Tripán	67
5.2	Avaliação da sensibilidade celular	71
5.2.1	Ensaio clonogênico	71
5.3	Avaliação do tipo de morte celular	73
5.3.1	Coloração diferencial pelo Brometo de Etídio (BE)/Acridina Laranja (AO)	73
5.4	Análise morfológica	77
5.4.1	Coloração diferencial pela Hematoxilina/Eosina	77
5.5	Avaliação da genotoxicidade	81
5.5.1	Teste do Cometa	81
5.6	Avaliação da motilidade e invasão celular	84
5.6.1	Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular <i>in vitro</i>	84
5.6.2	Migração vertical, utilizando câmara de Boyden	90

5.6.3 Invasão em matrigel, utilizando câmara de Boyden	92
6 DISCUSSÃO	94
7 CONCLUSÃO.....	105
REFERÊNCIAS.....	107
APÊNDICE	117
CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	117
EQUIPE CIENTÍFICA	118
RECURSOS FINANCEIROS	119

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é o câncer de pele mais grave em todo o mundo e sua ocorrência continua subindo a cada ano especialmente em países tropicais. Atualmente, a quimioterapia sistêmica é insatisfatória, pois apenas uma pequena minoria dos pacientes respondem de maneira aceitável (VASCONCELLOS et al., 2011; BROHEM et al., 2012).

A detecção em estágios iniciais é um elemento-chave para a evolução da doença, visto que não há cura para o melanoma em estágio avançado. A prevenção e o diagnóstico precoce são estratégias importantes, no entanto, o prognóstico do melanoma continua pobre apesar dos avanços significativos na compreensão da biologia e no seu tratamento, mostrando assim a importância de explorar outras maneiras de prevenir e tratar este tipo de câncer (FERRERES et al., 2009; INAMDAR et al., 2010; VASCONCELLOS et al., 2011).

Mutações no proto-oncogene *B-Raf*, localizado no cromossomo 7q, são elevadas em cânceres humanos (WAJAPYEE et al., 2008) e particularmente frequentes em melanomas humanos (40-50%) (SULLIVAN et al., 2013). Mutações em *B-Raf* excedem significativamente a frequência de outras mutações conhecidas em melanomas cutâneos como *N-Ras*, *Tp16* e *Tp53* (SHINOZAKI et al., 2004). Portanto, a frequente ocorrência de mutação *B-Raf* em melanomas sugere que inibidores específicos do gene *B-Raf* podem ser utilizados para o tratamento de melanomas avançados (MALDONADO et al., 2003).

O alto índice de melanoma no mundo frente aos demais tipos de câncer indicam uma dificuldade na prevenção e tratamento desta patologia, embora a detecção precoce, cirurgia adequada, e tratamento adjuvante venham melhorando

os resultados, o prognóstico do melanoma metastático é uma sobrevida mediana extremamente pobre, variando de 6 a 10 meses, com apenas 5% dos pacientes sobrevivendo mais de 5 anos. Muitos agentes têm sido investigados quanto a atividade antitumoral no melanoma, a exemplo destes o Vemurafenibe que foi aprovado recentemente elevou a taxa de sobrevida dos pacientes tratados para uma média de 15 meses (BOLLAG et al., 2012). Em revisão recente Jang e Atkins (2012) descreveram os benefícios da quimioterapia citotóxica combinada, seja com imunomoduladores como a interleucina 2 que promoveu um aumento de 16% de resposta às drogas citotóxicas ou com drogas supressoras de genes mutados responsáveis pelo surgimento e evolução das neoplasias, como o Vemurafenibe que obteve uma resposta em mais de 50% em pacientes com melanoma mutado no gene *B-Raf*, aumentando a sobrevida dos mesmos de 6 a 8 meses.

Tratamentos de melanoma mais eficazes são urgentemente necessários, o que exige a identificação de genes desregulados nas vias principais de controle de mutação, compreensão dos mecanismos que conferem resistência às drogas, e, a descoberta de agentes farmacológicos mais potentes e específicos, e sistemas farmacocinéticos de distribuição mais eficientes para esses medicamentos (INAMDAR et al., 2010). Assim, é de extrema importância o estudo de novas drogas para o tratamento do melanoma metastático (FRANKE et al., 2010).

Na constante busca por novos compostos, compostos benzotiazólicos mostram-se como uma importante alternativa, já que estudos tem demonstrado que eles possuem diversas atividades farmacológicas de interesse, tais como: antialérgico, anti-inflamatório, antitumoral, analgésico, antimicrobiano, anti-helmíntico, leishmanicida, e anticonvulsivantes. Compostos benzotiazólicos também demonstraram eficácia considerável como sobre a topoisomerase I/II e o

metabolismo do ácido trans-retinóico e de inibidores da aldosedutase (NOGUEIRA et al., 2010). A substância (*E*)-2-((2-(benzo[d]tiazol-2-íla)hidrazono)metil)-4-nitrofenol (AFN01) possui um grupo hidroxila na posição R1 e um grupo nitro na posição R4. Nitrocompostos despertaram interesse na terapia antitumoral agindo como *radiosensitizers*, considerando a capacidade de biorredução do grupo nitro que liberta intermediários no processo redox (NOGUEIRA et al., 2010)

Diante do exposto e considerando-se a importância de se explorar os possíveis mecanismos de ação de novas entidades bioativas, o presente trabalho avaliou a atividade do derivado benzotiazólico (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-íla)hidrazono)metil)-4-nitrofenol sobre a viabilidade celular, atividade clonogênica, mecanismo de morte celular, dano ao DNA, migração e capacidade de invasão *in vitro* em linhagens celulares de melanoma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

Câncer é um termo genérico que engloba um grupo de manifestações patológicas caracterizadas por proliferação celular descontrolada. Há mais de 200 tipos diferentes de câncer, cada um dos quais, com nomenclaturas de acordo com o tipo de tecido da célula de origem. Muitos pacientes com câncer não morrem em consequência do tumor primário, mas por causa dos efeitos sistêmicos das metástases. Dessa forma, o tratamento do câncer consiste em impedir o processo metastático tão cedo quanto possível (MADANI et al., 2011).

O tumor consiste em características biológicas que são adquiridas ao longo de seu desenvolvimento tais como: manutenção da sinalização proliferativa, impossibilidade de ação de supressores de crescimento, resistência a morte celular, possibilidade de imortalidade replicativa, indução de angiogênese, ativação de invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético e resistência a destruição pelo sistema imunológico (Figura 1). Essas características são possíveis devido a dois mecanismos: a instabilidade genômica em células cancerosas, que leva a formação de mutações aleatórias incluindo rearranjo cromossômico (dentre os quais há alterações genéticas que controlam a funcionalidade dos marcos do câncer); e o estado inflamatório de células pré-malignas e lesões malignas orientadas por células do sistema imunológico, alguns dos quais promovem progressão tumoral através de vários mecanismos (Figura 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Tumores geralmente crescem como aglomerados celulares em taxas dependentes de oxigênio e difusão de nutrientes, podendo ser benignos ou malignos (Figura 2). Quando atingem um tamanho máximo (1,0 - 2,0 mm), as células internas são incapazes de crescer e proliferar devido à falta de nutrientes e tornam-se quiescentes ou necróticas, levando à formação de uma estrutura de três camadas: um núcleo com células mortas rodeado primeiramente por uma camada de células quiescentes e em seguida, por uma borda fina de células em proliferação (figura 2) (BARRETO et al., 2011).



Figura 1 – Características do Câncer. As seis primeiras características funcionais do câncer são mantidas por mais duas características funcionais descobertas recentemente e duas características não funcionais que possibilitam a existência do tumor. Adaptado de: HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Células cancerígenas humanas exibem alterações específicas em sua estrutura cromossômica, tais como número e estrutura, que são responsáveis por mudanças na morfologia e comportamento bioquímico da célula, o que levam à proliferação rápida e descontrolada (figura 2) (MANOHARAN et al., 2010).

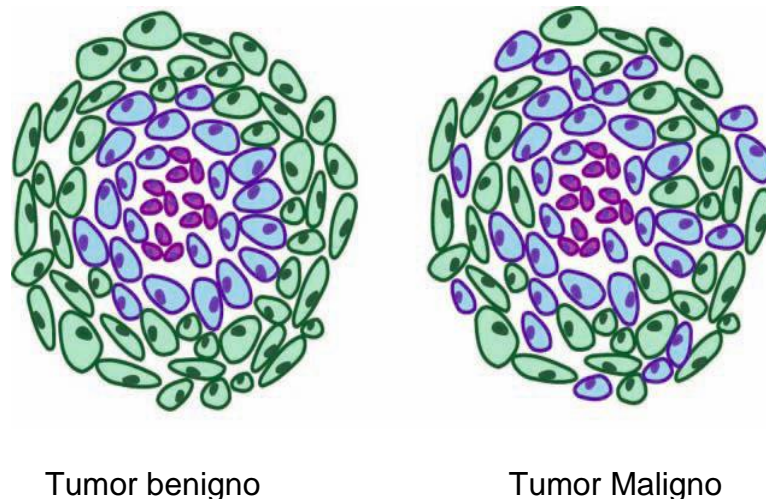


Figura 2 – Tipos de tumores. Em um tumor benigno células mutantes permanecem contido dentro de um único agrupamento, com um limite claro separando-os a partir de células normais. Em um tumor maligno, as células mutantes são misturados com as células normais, a tentativa de invadir o tecido circundante. As células ao centro na cor violeta mostram um núcleo neoplásico senescente. As células na cor azul demonstram a camada neoplásica em fase proliferativa. As células na cor verde demonstram o tecido normal adjacente ao tumor.

Fonte: BARRETO et al., 2011.

A proliferação celular crônica e frequentemente descontrolada que representa a essência de doenças neoplásicas envolve não somente controles desregulados de proliferação celular, mas também ajustes correspondentes do metabolismo energético com o intuito de suprir o crescimento e divisão celular. O metabolismo energético alterado se mostrou tão disseminado em células cancerosas como em outros traços associados ao câncer que tem sido aceito como um dos marcos do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Para a classificação dos tumores são levadas em consideração a célula normal que os originou e o seu estadiamento, os quais facilitam a compreensão do comportamento daquele tumor (ALMEIDA et al, 2005). O estadiamento refere-se a quantificação do grau de disseminação do tumor, para tal, há regras internacionalmente estabelecidas, as quais estão em constante aperfeiçoamento. O estadiamento do tumor reflete além da taxa de crescimento e da extensão da doença, o tipo de tumor e sua relação com o hospedeiro (MÉNORE, 2002).

O sistema de Classificação dos Tumores Malignos (TNM) é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC, 2009), e é o mais utilizado. Ele baseia-se nas características anatômicas da doença, levando em conta a extensão do tumor primário (T), o número dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M11, respectivamente.

Tabela 1 – TMN – Classificação Clínica do Melanoma

Classificação T	Espessura	Ulceração
T1	< 1,0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T2	1,0 – 2,0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,1 – 4,0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	> 4,0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
Classificação N	Número de linfonodos acometidos	-----
N1	1	a: micrometástases* b: macrometástases**
N2	2-3	a: micrometástases* b: macrometástases** c: metástases em trânsito e/ou satelitoses sem linfonodo metastático
N3	*4 ou metástases em trânsito e/ ou satelitose com linfonodo metastático	
Classificação M	Local	LDH sérico
M1a	Pele, subcutâneo ou linfonodos distantes	Normal
M1b	Metástase pulmonar	Normal
M1c	Outras metástases viscerais	Normal
	Qualquer metástase a distância	Elevado

*Micrometástases são diagnosticadas após linfadenectomia eletiva exérese do linfonodo sentinela.

**Macrometástases são definidos como linfonodos metastáticos detectados clinicamente e confirmados linfadenectomia terapêutica ou quando metástases nodais possuem grande extensão.

Fonte: Adaptado de Machado *et al.*, 2004.

Os fatores de risco de câncer encontram-se no meio ambiente ou podem ser hereditários. Cerca de 80% dos casos estão relacionados ao meio ambiente, o qual deve ser entendido como o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (quando não observados os cuidados com o trabalhador), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) e o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos) (ALMEIDA *et al.*, 2005). Em vários tipos de câncer a susceptibilidade genética tem papel importante, mas é a interação entre esta susceptibilidade e os

fatores ou as condições resultantes do modo de vida e do ambiente que determinam o risco do surgimento do câncer (BRASIL, 2006).

O câncer é um problema de saúde pública mundial. Segundo dados da Associação Americana do Câncer (*American Cancer Society - ACS*), nos Estados Unidos, uma em cada 4 mortes ocorrem devido ao câncer. A ACS com base em dados de incidência obtidos do Instituto Nacional do Câncer dos EUA (*National Cancer Institute*), do Centro para o controle e prevenção de doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*), e da Associação Norte Americana de Câncer Central (*North American Association of Central Cancer*) e de mortalidade obtidos do Centro Nacional para Estatísticas de Saúde (*National Center for Health Statistics*) estima que para o ano de 2012, um total de 1.638.910 novos casos de câncer e 577.190 mortes por câncer devem ocorrer nos Estados Unidos (SIEGEL et al., 2012).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer, estima para os anos de 2012 e 2013 a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos câncer de pele não melanoma, que é o mais incidente em ambos os sexos (134 mil casos novos). Seguidos dos casos de câncer de pele não melanoma os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino. Para o Amazonas estima-se uma taxa de 1,24 casos para cada 100.000 homens e 0,44 casos para cada 100.000 mulheres (BRASIL, 2013).

A dimensão da incidência do câncer, que é a segunda maior causa de morte no país, evidencia que este precisa ser encarado como um grave problema de saúde pública (SILVA et al., 2011). O conhecimento sobre a situação dessa doença

permite estabelecer prioridades e alocar recursos de forma direcionada para a modificação positiva desse cenário na população brasileira (BRASIL, 2013).

Nas últimas décadas houve grandes avanços na compreensão das causas, progressão e, em particular, dos genes que afetam o desenvolvimento do câncer. Tais conquistas possibilitam melhorias nas ferramentas para a detecção e tratamento do câncer, o que é imprescindível, uma vez que um fator importante para o êxito da terapia é a precocidade no diagnóstico do tumor (MYC PROTEIN, 2011 apud BARBOSA, 2012).

O tratamento do câncer requer a colaboração de uma equipe multidisciplinar e diferentes modalidades de tratamento. Os tratamentos locais convencionalmente incluem a cirurgia e a radioterapia, mas a quimioterapia regional é de uso comum. Tumores sólidos são difíceis de tratar, porém a quimioterapia tem um papel importante a desempenhar na cura e no controle de uma ampla gama de doenças malignas (PARNELL& WOLL, 2003).

É crescente o otimismo de que a pesquisa e tratamento do câncer estão entrando numa nova era. Desde a década de 50, quando as primeiras curas de câncer reais foram obtidas com terapias combinadas, o progresso no tratamento do câncer tem sido lento e com poucas e notáveis exceções, os avanços vieram de observações empíricas na clínica e não de compreensão detalhada da doença (CANTLEY& BASELGA, 2011).

2.2 Melanoma

O melanoma maligno é um dos poucos cânceres que vem aumentando em prevalência, bem como sua taxa de mortalidade em todo o mundo (FERNANDEZ et

al., 2012; FRANKE, 2010; GANDINI et al., 2011; HU et al., 2011). Pacientes nos estágios iniciais da doença (estágios I ou II) geralmente possuem bom prognóstico em relação aos pacientes em fase avançada (estágios III ou IV), os quais continuam a contribuir para a alta morbidade e mortalidade da doença (FERRERES et al., 2009; INAMDAR et al., 2010).

Tabela 2 - Resumo dos Grupos de Estadiamento

Estágio Clínico	Características
IA (baixo risco)	Melanoma $\leq 1,0$ mm de espessura e nível II ou III (Clark), sem ulceração.
IB-IIA-IIB-IIC (risco intermediário a alto)	Melanoma $\leq 1,0$ mm de espessura com ulceração, ou nível IV ou V (Clark). Melanomas $> 1,0$ mm de espessura com quaisquer características e linfonodos não comprometidos clinicamente.
III	Linfonodos clinicamente palpáveis, ou linfonodo sentinela positivo.
IV	Metástases à distância

Fonte: Adaptado de Houghton et al., 2007.

A progressão tumoral do melanoma ocorre por meio de sucessivas fases que tem sido reconhecidas por meios clínicos e histológicos. Os melanomas normalmente proveem de nevos atípicos pré-existentes que tornam-se posteriormente displásicos. A próxima etapa é a fase de crescimento epidérmico radial (RPG) e envolve proliferação dessas células na epiderme. Esta etapa é invasiva, através do qual o câncer invade a derme. Em seguida, tem-se a fase de crescimento vertical (VPG) na qual os melanócitos proliferam na derme e o melanoma é clinicamente acompanhado pelo aparecimento de nódulos. A última fase, metástase, é caracterizada por um movimento das células tumorais para os linfonodos e órgãos distantes (MERCER & PRITCHARD, 2003). Tais fases estão esquematizadas na figura 3.

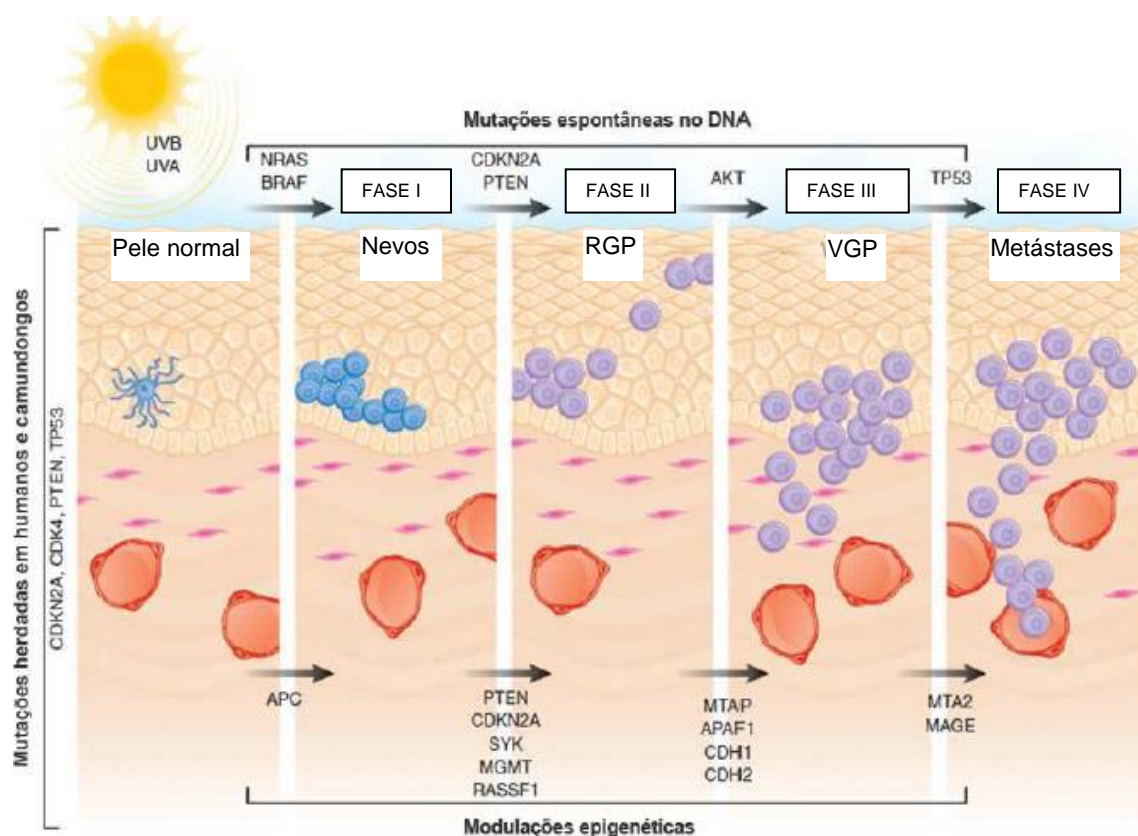


Figura 3 – Desenho esquemático mostrando as etapas da progressão do melanoma humano e as alterações moleculares associadas com a iniciação e progressão tumoral. Fonte: SILVA, 2010.

As taxas de incidência de melanoma e câncer de pele não-melanoma (CPNM) estão aumentando a um ritmo acelerado, especialmente entre mulheres jovens (GANDINI et al., 2011). Estima-se para 2012/2013 cerca de 6230 casos novos no Brasil, tendo na região Sul, as maiores taxas estimadas para homens e mulheres (Figura 4) (BRASIL, 2013).

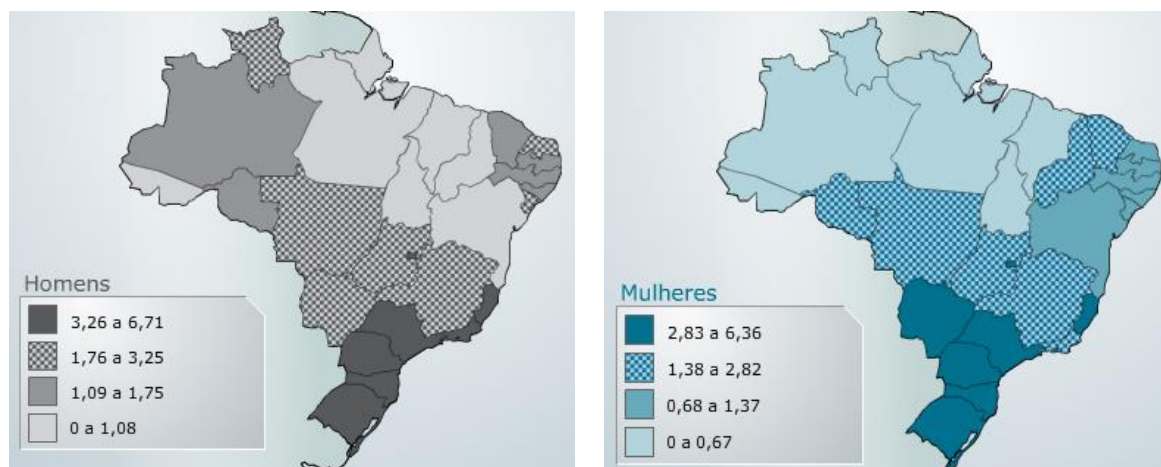


Figura 4 – Representação espacial das taxas brutas de incidência de melanoma maligno da pele por 100 mil homens e 100 mil mulheres estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação.






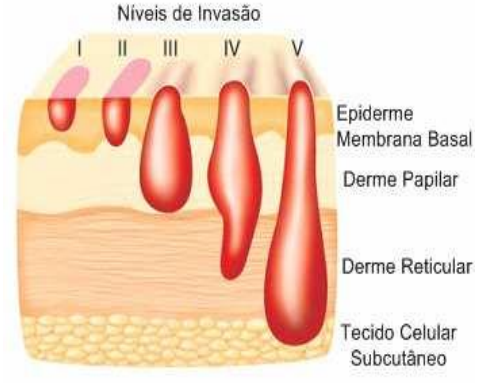
Fonte: BRASIL, 2013.

O melanoma ocorre principalmente em populações brancas, no entanto, todos os grupos étnicos são afetados em alguma proporção (FERNANDEZ et al., 2012; BRASIL, 2013). Sua ocorrência é influenciada por fatores de risco endógenos e ambientais, tais como a exposição solar (FAGUNDO et al., 2011). A idéia atual é que a exposição repetida a radiação UV é o principal fator de risco para neoplasias na pele exposta ao sol, enquanto que fatores genéticos e predisposição são fatores-chave na etiologia da doença sobre a pele não exposta ao sol. Talvez, eventos isolados de exposição aos raios UV, estejam contribuindo para o potencial de neoplasias (FERNANDEZ et al., 2012). Uma quantidade muito grande de nevi (pintas escuras) está correlacionada com um maior risco de desenvolver melanoma (BAUER & GARBE, 2003).

Se detectados em estádios iniciais, os melanomas são curáveis e seu prognóstico é considerado bom (BRASIL, 2013). O diagnóstico precoce e a excisão cirúrgica são os principais objetivos na prevenção secundária do melanoma cutâneo. Atualmente, o diagnóstico de melanoma baseia-se em quatro aspectos comumente observados nesse tipo de tumor: assimetria, bordas irregulares, variação na

coloração e um diâmetro maior do que 5,0 mm. A maioria dos melanomas são diagnosticados corretamente seguindo essa regra, no entanto, uma proporção variável de melanomas não cumprem esses critérios. Quando há suspeita de lesão cutânea faz-se necessária a excisão para que haja em seguida a análise por meio de uma biópsia. A biópsia geralmente permite uma determinação precisa da malignidade da lesão (ARMENGOL, 2011).

Tabela 3 – Variedades de Melanoma

1. Melanoma superficial difuso (variação na coloração).	2. Lentigo maligno melanoma (lesão > 5,0 mm).
	
3. Melanoma nodular (bordas irregulares).	4. Melanoma lentiginoso acral (assimetria).
	
5. Nevos melanocíticos de diversos tamanhos e nevos melanocíticos congênitos gigantes em região lombar esquerda e dorso (sacro) do paciente.	6. Níveis de invasão.
	 <p>Níveis de Invasão</p> <p>I II III IV V</p> <p>Epiderme Membrana Basal Derme Papilar Derme Reticular Tecido Celular Subcutâneo</p>

Fonte: Adaptado de Nascimento, 2007.

O melanoma maligno vem sendo intensamente investigado devido ao seu elevado potencial metastático. No momento do diagnóstico, um grande número de pacientes com melanoma já tem metástases, o que é a principal causa de morte entre eles. A sobrevivência a longo prazo para pacientes com melanoma metastático é de apenas 5%. Este tipo de tumor é quase insensível à regimes padrão de quimioterapia, e os agentes quimioterapêuticos disponíveis são limitados (HU et al., 2011).

O tratamento do melanoma consiste principalmente na intervenção cirúrgica padrão incluindo ampla excisão local e biópsia do linfonodo sentinela nos tumores de tamanho adequado (STUCKY et al., 2010). A abordagem farmacológica padronizada para o tratamento de melanomas primários é o tratamento com dacarbazina, carboplatina e paclitaxel, drogas utilizadas como complemento à remoção cirúrgica (TARHINI & AGARWALA, 2006).

A linfadenectomia cirúrgica é indicada principalmente antes de outras formas de terapia sistêmica mesmo nos casos de metástases regionais nodais em melanoma (STUCKY et al., 2010). Considerando que o tumor primário envolve a pele, a difusão para órgãos viscerais é incurável, com tempo médio de sobrevivência inferior a 12 meses. A malignidade do tumor baseia-se em uma resistência pronunciada à quimioterapia convencional, relacionada com defeitos na sinalização proapoptótica (FRANKE et al., 2010).

É durante as fases iniciais da progressão do melanoma que ocorrem mutações em genes que causam ativação anormal de reguladores do ciclo celular como *N-Ras* e *B-Raf* (DAVIES et al., 2002).

A reversão da tumorigênese pode ocorrer na segunda fase de progressão do melanoma. As alterações dessa fase geralmente afetam os mecanismos de reparo

do DNA e a regulação do processo de apoptose. A progressão ou regressão da tumorigênese depende da presença ou da ausência de alterações em genes capazes de impedir a proliferação de células que possuem o seu genoma alterado. Os genes *CDKN2A* (Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A) e *PTEN* (homólogo a fosfatase e angiotensina) são exemplos desses genes, eles são supressores de tumores que promovem a parada do ciclo celular e estimulam a apoptose, através das vias de sinalização esquematizadas na figura 7. *CDKN2A* codifica para dois supressores de tumor distintos, *p16INK4A* (inibidor de quinases dependentes de ciclinas - CDKs), e *p14ARF* (promotor de apoptose após a ocorrência de danos ao DNA) . Já o *PTEN* é um gene que codifica para uma fosfatase que atenua a sinalização desencadeada por fatores de crescimento que utilizam fosfatidilinositolfosfato como segundo-mensageiro (DAHL & GULDBERG, 2007; JACOMASSO, 2010; SILVA, 2010;).

Melanomas que ocorrem em diferentes localizações anatômicas são biologicamente distintos, tendo espectros de mutação diferentes nos principais mensageiros secundários, perfis de expressão de proteínas e etiologias subjacentes (FERNANDEZ et al., 2012). O melanoma, apesar de ser o tipo mais raro de câncer de pele, é o mais letal devido à sua elevada tendência a sofrer metástases. A característica migratória dos melanócitos que os originam pode explicar a rapidez com que os melanomas progridem até a metástase (JACOMASSO, 2010).

2.3 *Tp53* e melanoma

Oncogenes e genes supressores de tumor têm sido associados a diferentes tipos de neoplasias, sendo o gene *p53* o que com maior frequência apresenta

alterações. Este gene localiza-se no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), possui 11 exóns que abrangem uma área de 200.000 pares de base e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD que contém 393 aminoácidos (Figura 5). Esta proteína é capaz de se ligar a seqüências específicas do DNA sendo um fator de transcrição que controla de forma positiva ou negativa a expressão de diversos genes envolvidos em várias vias celulares. Dentre as vias mais importantes se destacam a inibição da replicação do DNA, funcionando como uma molécula de check point da progressão da célula no ciclo celular da fase G1 para a fase S e também da fase G para fase M (KLUMB E CAVALCANTI JR, 2002)

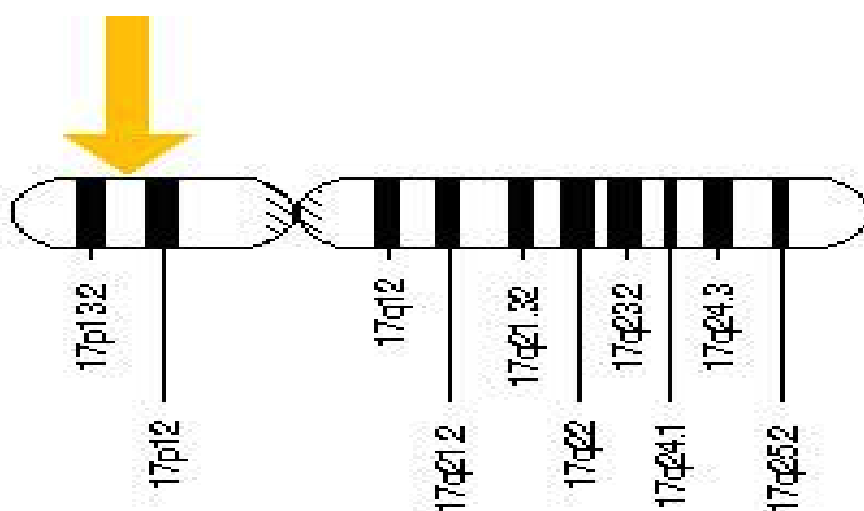


Figura 5 – Representação da localização do gene *Tp53* no cromossomo 17.
Fonte: Genetics Home Reference.

Alterações moleculares que envolvem oncogenes (*ARN*, *B-Raf*, *KIT*, *CDK4*, *CCND1*, *ERBB4*, *AKT*, *NEDD9*, *GNAQ* e *GNA11*), fatores de transcrição (*MITF*, *MYC* e *ETV1*) e supressores de tumor (*CDKN2Ap 6*, *Tp53*, *BAP1* e *PTEN*) têm sido relatados em melanoma. Vias reguladoras que reduzem a resposta imunitária do cancro estão também a ser cada vez mais bem caracterizadas. Uma melhor compreensão das aberrações moleculares subjacentes nas células tumorais, vias

imunorreguladoras, e as mudanças do microambiente do tumor que contribuem para a progressão do melanoma tem ajudado o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para pacientes com esta doença (JANG E ATKINS, 2013).

O *Tp53* mutante "inativo" ou ainda suas pró-proteínas são capazes de se auto-ligar ao DNA. Essas ligações a sequências de DNA que são não-canônicas para *Tp53* podem gerar, entre outros, um conseqüente aumento na transcrição e na expressão de receptores de fatores de crescimento, tais como ERbB1, 1,2 ou seja, a mutação de *Tp53* não apenas resulta em "inativação da função do *Tp53*", mas na verdade, resulta na "ativação da função oncogênica do *Tp53*". E de acordo com esse postulado, transdução de células "*Tp53* nulas" com *Tp53* mutante podem causar neoplasias (DENT, 2013).

O supressor de tumor *Tp53* pode também definir novos subtipos de tumor moleculares, onde a presença de uma mutação p53 determina a abordagem terapêutica (VIDWANS et al., 2011). O *Tp53* selvagem (*WTp53*) é um potente indutor de apoptose, a parada do ciclo celular e a senescência celular que estão presentes em níveis indetectáveis em tecidos normais e é estabilizado e ativado em resposta ao estresse celular e estímulos, tais como a luz ultravioleta (UV) ou por ativação de oncogenes. Na maior parte dos tumores, o *Tp53* é mutado, o qual não só desativa a sua atividade supressora de tumor, mas pode conferir um potencial oncogênico (BOX et al., 2013). No melanoma, *WT p53* se encontra inativado em 90% dos casos, com 10% de mutações pontuais incapacitantes (HOCKER e TSAO, 2007), embora este número possa chegar a 19% (HODIS et al., 2012). Com base na taxa relativamente baixa de mutação *Tp53* e o sucesso dos inibidores de *B-Raf V600E*, tem havido grande interesse em reexaminar os velhos paradigmas da ativação do *Tp53* durante a quimioterapia convencional para determinar se as

funções anti-tumorais poderosas do *Tp53* selvagem podem ser aproveitadas para benefícios clínicos. O gene *Tp53* é um alvo chave de muitos quimioterápicos convencionais, que têm se mostrado geralmente ineficazes como agentes autônomos. Por exemplo, a dacarbazina, um potente agente alquilante que induz a morte de células tumorais dependentes de p53, não tem a capacidade de prolongar a vida em pacientes com melanoma metastático. Apesar do fraco desempenho clínico de dacarbazina como um agente anti-melanoma, os avanços na compreensão da regulação da via *Tp53* no câncer e no desenvolvimento de novos reagentes pré-clínicos poderosos para estudar sua regulação provocou uma reavaliação da área (BOX et al., 2013).

2.4 *B-Raf* e melanoma

Atualmente, diversos genes são relacionados com o desenvolvimento e progressão do melanoma, sendo a mutação do gene *B-Raf* o principal biomarcador deste tumor (CHIN, 2008).

O nome oficial do *B-Raf* é "homólogo B do oncogene viral de sarcoma murinho V-RAF". Este gene se localiza na posição 34 do braço longo do cromossomo 7 (7q34), possui 18 exóons que abrangem uma área de 190.284 pares de base e codifica uma proteína nuclear de 92 kD que contém 766 aminoácidos. Aproximadamente 90% das mutações de *B-Raf* são encontradas no éxon 15, em um único resíduo de aminoácido, geralmente em uma substituição de valina por ácido glutâmico na posição 600 (V599E, que passou a ser referido como V600E) (DAVIES et al., 2002; WAJAPYEE et al., 2008; BOLLAG et al., 2012).

As mutações que conduzem à ativação de *B-Raf*, localizado no cromossomo 7q (Figura 6), têm sido encontradas na maioria dos melanomas esporádicos, tornando *B-Raf* o gene mais mutado em melanomas com uma taxa de mutação que vão desde 40% a 50% (DAVIES et al., 2002; WAJAPYEYEE et al., 2008; DHOMEN & MARAIS, 2009). Já as mutações no gene *N-Ras* estão presentes em cerca de 15% dos melanomas (JACOMASSO, 2010). Essas mutações excedem significativamente a frequência de outras mutações conhecidas em melanomas cutâneos como *N-Ras*, *Tp16* e *Tp53* (SHINOZAKI et al., 2004).

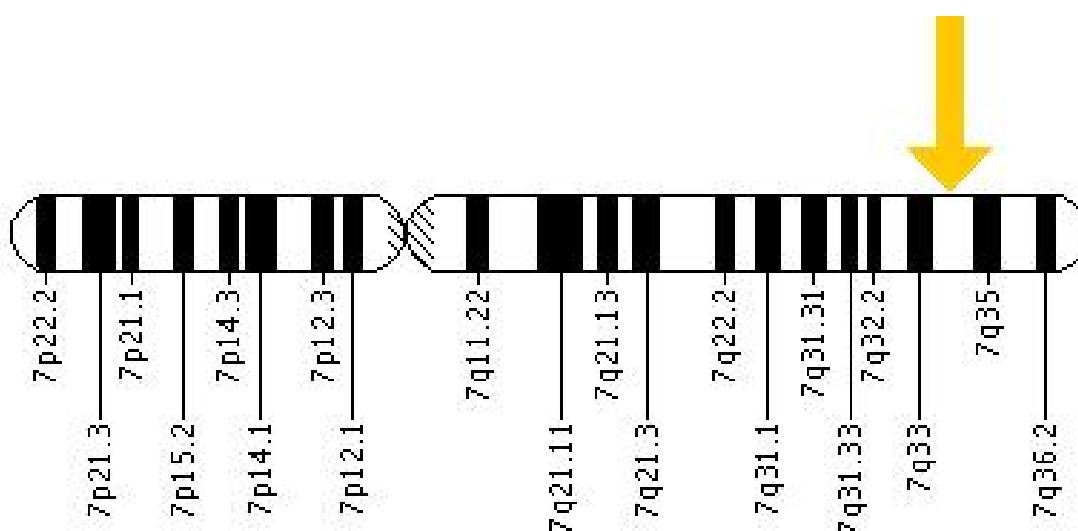


Figura 6 – Representação da localização do gene *B-Raf* no cromossomo 7.
Fonte: Genetics Home Reference.

O gene *B-Raf* é uma das três serina/treonina quinases da família *Raf*. Os membros da família *Raf* codificam uma cascata serina/treonina quinase na via *Ras/Raf/MAPK/MEK/ERKquinase*, a qual é uma via de transdução de sinal que retransmite sinais extracelulares a partir da membrana celular para o núcleo através de uma série ordenada de eventos de fosforilação consecutivos. Tipicamente, um ligante extracelular se liga ao seu receptor tirosina-quinase, levando a ativação de *Ras*, iniciando uma cascata de eventos de fosforilação. O *Ras* ativado fosforila e

ativa *Raf*, que também fosforila e ativa *MEK1* e *MEK2* que ativam e fosforilam *ERK1* e *ERK2* (via exemplificado na figura 7 e destacada na figura 8). *ERK1* e *ERK2*, fosforilam diversos alvos citoplasmáticos e nucleares que conduzem finalmente a expressão de proteínas que desempenham papéis importantes no crescimento e sobrevivência celular (DAVIES et al., 2002; SHARMA et al., 2005).

Estudos demonstraram que a via *Ras/Raf/MEK/ERK* (figura 8) é hiperativada na maioria dos melanomas humanos, e que esta via tem um papel crítico na regulação da proliferação de células de melanoma, invasão e sobrevivência. Os genes *Raf* e *Raf* foram identificados há mais de 25 anos atrás. *Ras* é uma pequena proteína G que se liga à superfície interna da membrana plasmática e, *Raf*, *MEK*, e *ERK* são proteínas quinases que formam uma cascata de quinases de três camadas (DHOMEN & MARAIS, 2009).

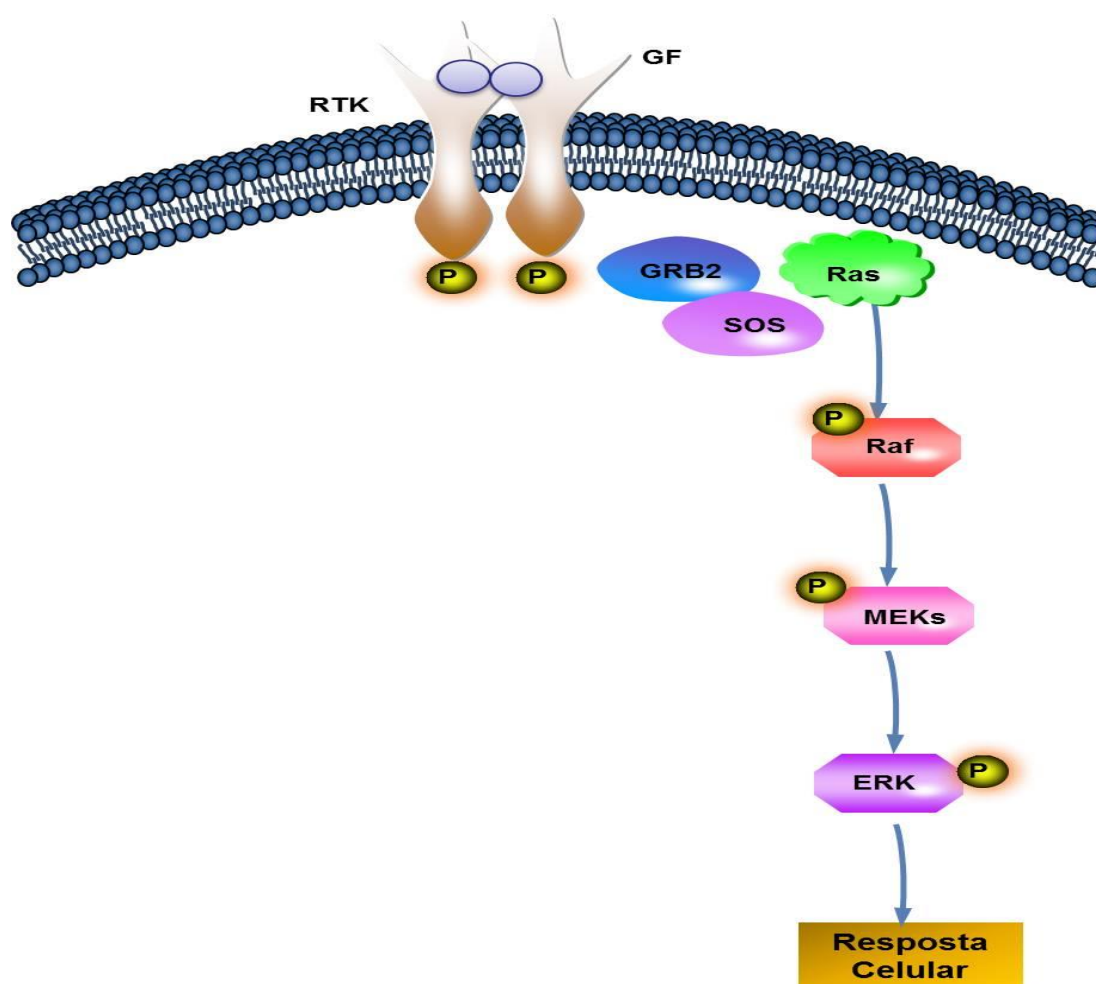


Figura 8 – Visão geral da via de sinalização *Ras/Raf/MEK/ERK*. Após a ligação de fatores de crescimento (GF) a receptores tirosina-quinase (RTK), *Ras* é ativada na membrana plasmática via GRB2 e SOS. *Ras* ativado recruta *Raf* para a membrana plasmática, por sua vez torna-se ativada. *Raf* fosforila e ativa *MEK*, que por sua vez fosforila e ativa a *ERK*. *ERK* ativado medeia várias respostas celulares, tais como a proliferação, a sobrevivência e a diferenciação celulares.

Fonte: Adaptado de DHOMEN & MARAIS (2009).

O melanoma cutâneo é um tradicional exemplo de neoplasia que avança galgando diferentes estágios identificados através de características clínicas e histológicas. Porém, o evento molecular chave que desencadeia sua progressão ainda não foi elucidado, o que esclarece porque não há terapia específica para seu tratamento e porque quase nenhum benefício clínico de novas terapias foi claramente demonstrado em pacientes com melanoma desde a década de 70 (WINNENPENNINCKX et al., 2006).

Mutações no gene *B-Raf* também estão presentes em até 82% de nevos melanocíticos, que são lesões benignas da pele que raramente evoluem para melanoma. A expressão de B-RAFV600E em culturas primárias de melanócitos humanos também induz senescência (WAJAPEYEE et al., 2008).

A elevada ocorrência de *B-Raf* mutados em melanomas apontam que a ativação da cascata *MAPK* simboliza um rito de passagem obrigatório na transformação dos melanócitos e tal dependência pode representar um ponto de ataque para o tratamento desta neoplasia (CHIN, 2008).

Esta mutação promove o crescimento do tumor através da proliferação celular e angiogênese. *B-RAFv600E* também regula a interleucina-8, que promove a adesão de melanócitos para a vasculatura, ajudando na promoção de metástases (SWICK & MAIZE, 2012).

O gene *B-Raf* mutado é apenas uma via para o melanoma. Oncogenes *B-Raf* também podem ser encontrados em nevos típicos e atípicos. Neles, o gene *B-Raf* inicialmente provoca o crescimento em lesões que eventualmente param de proliferar e permanecem benignas. Genes *B-Raf* mutados também ocorrem frequentemente em pessoas com níveis elevados de exposição aos raios ultravioleta no início da vida. As lesões referentes a mutações no *B-Raf* possuem características

microscopicamente específicas, apresentando-se maiores, mais arredondadas, e com melanócitos mais pigmentados (SWICK & MAIZE, 2012).

Nevos podem permanecer adormecidos por muitos anos apesar da presença de mutações do *B-Raf*, indicando que outras mutações em outros genes devem ocorrer para a doença progredir para malignidade (MERCER & PRITCHARD, 2003). Porém sabe-se que esta mutação aumenta a atividade basal de quinase do *B-Raf*, resultando na hiperatividade da via *MAPK*, a qual é evidenciada por níveis elevados da ativação das quinases *MEK* e *ERK* (SHARMA et al., 2005). Como já discutido essa via tem papel crítico na regulação da proliferação de células de melanoma, invasão e sobrevivência (DHOMEN & MARAIS, 2009).

Com a descoberta das mutações *B-Raf* em melanomas iniciou-se o desenvolvimento de pesquisas em busca de terapias efetivas para essa doença, tendo o próprio gene *B-Raf* como um alvo terapêutico inicial para a doença, já que a maioria das mutações envolvem um único resíduo aminoácido da proteína. A identificação da alta taxa de mutações sinaliza também que outras moléculas da cascata *Ras/Raf/MAPK* podem servir como alvo terapêutico, pois diversos receptores tirosina-quinase bem como *Ras* estão mutados em alguns casos de melanomas (HALUSKA, 2007).

A elevada frequência de mutação faz com que o gene *B-Raf* seja um atraente alvo terapêutico para melhorar a eficácia dos tratamentos para pacientes estágio avançado de melanoma. No entanto, é incerto se a segmentação *B-Raf* é suficiente para inibir a tumorigênese melanoma, e o mecanismo pelo qual isto pode ocorrer é desconhecido (SHARMA et al., 2005).

A disponibilidade de novos medicamentos para os componentes desta via significa que as terapias-alvo estão se tornando rapidamente uma opção real no

manejo clínico (DHOMEN & MARAIS, 2009). Agentes específicos para o gene *B-Raf*, como o Sorafenib estão sendo atualmente investigados (HALUSKA, 2007).

2.5 Tratamento do Melanoma

O êxito no tratamento do melanoma depende muito de um diagnóstico precoce. Em 80% dos casos onde a doença está menos avançada, a cirurgia para remoção da massa tumoral juntamente com uma parte do tecido circundante, já é o suficiente para a eliminação do melanoma. A abordagem farmacológica padrão para o tratamento de melanomas primários é o tratamento com dacarbazina, carboplatina e paclitaxel, drogas utilizadas como complemento à remoção cirúrgica (JACOMASSO, 2010). Com a utilização de abordagens moleculares diversas drogas importantes para o tratamento do melanoma foram surgindo (as quais são descritas no decorrer deste capítulo da dissertação) (Figura 9).

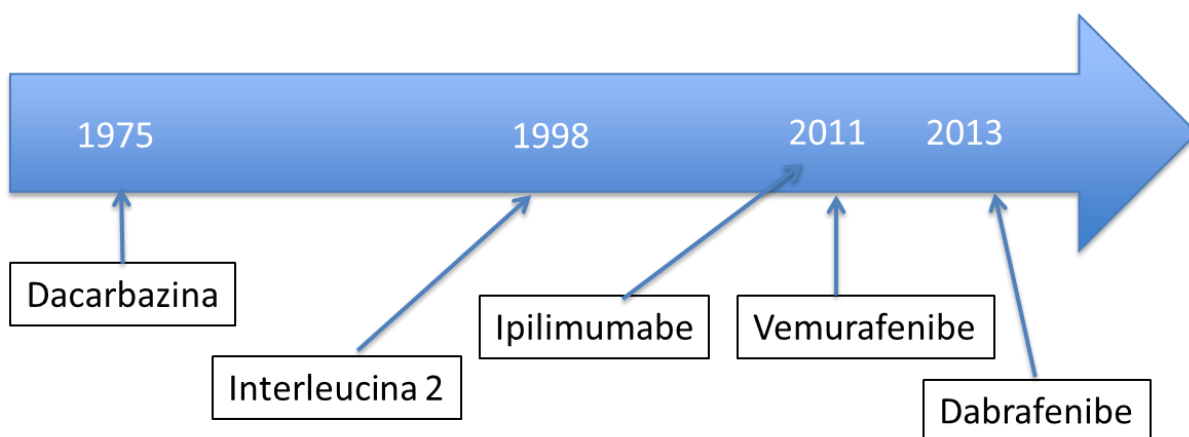


Figura 9 – Drogas aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento do melanoma.

Adaptado de: JONG & ATKINS, 2013.

Algumas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas para tentar melhorar o tratamento do melanoma cutâneo. Alternativas com eficácia terapêutica, onde haja

um balanço entre benefício e toxicidade em relação à dose-resposta, tem sido estudadas. Nesse sentido, a quimioterapia e imunoterapia têm sido utilizadas isoladamente, ou em associação com vacinas e anticorpos monoclonais (QUEIROLO et al., 2005).

Nos Estados Unidos um tratamento com altas doses de interleucina-2 (IL-2) foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), com base em um número de estudos fase II com um total de 277 pacientes, mostrando respostas completas e duradouras em 7% dos pacientes. A maioria destes pacientes foram considerados curados. Outras citocinas, incluindo IFN, não estão aprovados para o melanoma avançado, quer nos EUA ou na Europa. DTIC é a única droga aprovada nos dois continentes. Fotemustina está aprovado apenas em alguns países da Europa, com base nos resultados de um ensaio de fase III demonstrando um atraso no aparecimento de metástases no cérebro (EGGERMONT; ROBERT, 2011).

O anticorpo monoclonal anti-linfócito T citotóxico proteína associada 4 (CTLA-4) demonstrou em estudos ativar o sistema imunológico, causando aumento da resposta imune do paciente ao tumor. Atualmente, existem dois produtos representativos, o Ipilimumabe (BMS/Medarex), um isotipo IgG1 que fixa o complemento, e tremelimumabe (Pfizer), um isotipo IgG2 que não fixa o complemento. A droga Ipilimumabe foi avaliada em estudos de fase II sugerindo um efeito dose-resposta claro e um padrão único de respostas (MOUAWAD et al., 2010).

O avanço no conhecimento das vias de sinalização que estão desreguladas no melanoma vem permitindo o desenvolvimento de novos fármacos e esquemas terapêuticos que auxiliem no seu tratamento. Estes novos tratamentos visam à interrupção de cascatas regulatórias que estão excessivamente ativadas em células

tumorais, como por exemplo a cascata da via *Ras/Raf/MEK/ERK* (Figura 10). Quinases, proteases e fosfatases destas vias de sinalização estão entre os alvos mais promissores para serem modulados por novas moléculas capazes de interagir com os seus sítios catalíticos de forma específica. Fármacos que possuem especificidade para *B-Raf* V600E foram desenvolvidos recentemente e sua citotoxicidade foi comprovada como ocorrendo apenas em linhagens de melanoma que possuem este alelo mutado (JACOMASSO, 2010).

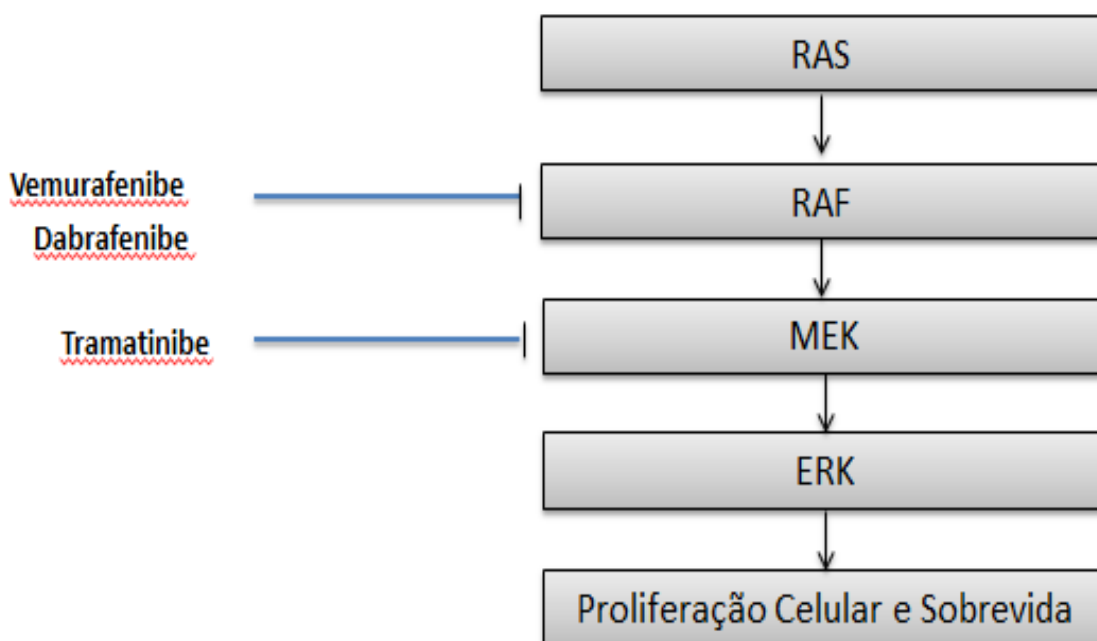


Figura 10 – Via de sinalização *MAPK* e alvos de atuação de drogas antimelanoma. Adaptado de: JANG & ATKINS, 2013.

O primeiro inibidor de *B-Raf* seletivo a ser desenvolvido no contexto clínico foi o Vemurafenibe. Este medicamento tem demonstrado uma impressionante atividade como agente clínico único, com taxas de resposta de cerca de 80%. Os eventos adversos mais comuns foram artralgia, erupção cutânea, fotossensibilidade, fadiga, alopecia, prurido e papiloma (EGGERMONT; ROBERT, 2011; BOLLAG et al., 2012).

Fármacos que inibem a sinalização de *Ras* também são promissores no tratamento de melanomas. Exemplos destes fármacos são as moléculas que inibem a Ras-farnesiltransferase. Esta enzima é responsável por uma modificação pós traducional sem a qual *Ras* não possui atividade. O tratamento de linhagens de melanoma *in vitro* com estes inibidores as tornou mais sensíveis à cisplatina (JACOMASSO, 2010).

O número de casos de melanoma no mundo está aumentando mais rapidamente do que qualquer outro câncer. Embora a detecção precoce, cirurgia adequada, e tratamento adjuvante venham melhorando os resultados, o prognóstico do melanoma metastático continua muito deficiente. Melanoma avançado ainda está associada com uma sobrevida mediana extremamente pobres, variando de 2 a 8 meses, com apenas 5% dos pacientes sobrevivendo mais de 5 anos. Muitos agentes têm sido investigados quanto a atividade antitumoral no melanoma, mas as opções de tratamento atuais para pacientes com doença metastática são limitados e não-curativas, na maioria dos casos (MOUAWAD et al., 2010).

Por fim, terapias que estimulem a apoptose das células tumorais já estão disponíveis para o tratamento de melanoma, como por exemplo oligonucleotídeos antisense contra Bcl-2. Todas estas novas abordagens farmacológicas são decorrentes da identificação de alvos moleculares relevantes para o surgimento e progressão do melanoma. A identificação das alterações moleculares relacionadas ao melanoma é, portanto, de grande importância para o avanço na descoberta de tratamentos mais eficazes (JACOMASSO, 2010).

2.6 Compostos Benzotiazólicos

Benzotiazóis são compostos com anel benzeno ligados ao anel tiazol (Figura 11). Estes compostos foram muito estudados na década de 50 quando descobriu-se que atuavam como relaxantes musculares de ação central. No entanto, em seguida os químicos medicinais deixaram de ter interesse em seu estudo, tendo o interesse por estes compostos ressurgido apenas após a descoberta do Riluzole (6-trifluorometoxi-2-benzotiazolamina). Desde então, derivados benzotiazólicos tem sido exaustivamente estudados e uma gama de atividades biológicas tem sido verificadas (Tabela 4). Apesar de serem conhecidos há muito tempo, seus variados recursos biológicos ainda são de grande interesse científico (RANA et al., 2007).

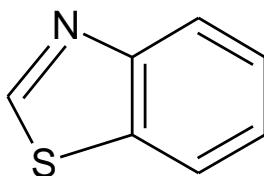


Figura 11 – Estrutura química da classe Benzotiazol. O anel heterocíclico (com átomo de enxofre (S) e nitrogênio (N)) e o anel tiazol.

Benzotiazóis são compostos de interesse para o estudo do câncer, eles tem apresentado atividades antitumorais significantes, principalmente, os fenil substituídos (BRADSHAW et al., 2002; HUTCHINSON et al., 2002). Um mecanismo pelo qual os benzotiazóis podem atuar em células cancerígenas foi estudado por Bazzi e colaboradores (2009), eles descobriram que estes compostos são ligantes do receptor hidrocarboneto de arila (AhR) e que há um indução parcial de AhR por esses compostos. A via de transdução de sinal do AhR (um fator de transcrição) é

quem regula a indução de CYP1A1 (uma das diversas isoformas do citocromo P450) (BRADSHAW et al., 2002).

Tabela 4 - Atividades Biológicas de derivados Benzotiazólicos

Tipos de derivados benzotiazólicos	Atividade
Pirimido Benzotiazóis; Benzotiazóis derivados de quinolinas; Imidazo Benzotiazóis;	Antitumoral
Pirimido Benzotiazóis; Quinazolininas benzotiazólicas	Antiviral
Benzotiazóis amidino bis-substituídos	Potenciais agentes anti-HIV
6-nitro-e 6-aminobenzothiazóis substituídos	Antimicrobiana

Fonte: Adaptado de Rana et al., 2007 e Nogueira et al., 2010.

Nogueira e colaboradores (2010) estudaram a atividade antitumoral de diversos derivados benzotiazólicos, entre eles o (*E*)-2-((2-(benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol, para o qual relataram uma boa atividade citotóxica contra linhagens celulares de leucemia (HL-60). O derivado foi o composto mais ativo, com CI50 variando 0,52 – 4,40 μ M em HL-60 e MDAMB-435, respectivamente. O derivado parece ser seletivo para linhagens de HL-60, sendo quase dez vezes mais potente do que nas outras células testadas.

O derivado (*E*)-2-((2-(benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol possui um grupo hidroxila na posição R1 e um grupo nitro na posição R4, e no estudo realizado por Nogueira e colaboradores (2010) foi ativo contra as três linhagens de câncer estudadas, leucemia (HL-60), mama(MDAMB-435) e cólon (HCT-8). Nitrocompostos despertaram interesse na terapia antitumoral agindo como *radiosensitizers*, considerando a capacidade de biorredução do grupo nitro que liberta intermediários no processo redox.

O benzotiazol 2-(-4-aminofenil)benzotiazol e seus análogos são uma classe altamente específica e potente de atividade antitumoral. Esses compostos são

reconhecidos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA) como uma classe mecanística distinta de outros agentes quimioterapêuticos utilizados na clínica. Esses compostos atuam como potentes agonistas do AhR, resultando na indução de CYP1A1, gerando espécies reativas eletrofílicas que juntamente com o DNA formam adutos levando, conseqüentemente, a morte celular com ativação da cascata apoptótica. Eles também apresentam pobre propriedade físico-química e farmacêutica que interferem na sua biodisponibilidade (DUBEY et al., 2006).

A alteração de ligações químicas de moléculas é um método comum para desenho de fármacos em química medicinal e uma técnica útil para o desenvolvimento de novos medicamentos. A síntese de novos compostos benzotiazólicos, por exemplo, apresentou muita vantagem para o tratamento de tipos específicos de câncer (AKTAR et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial anticâncer do benzotiazol (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol (AFN01) em três (03) linhagens celulares de melanoma maligno com diferentes mutações. Sk-Mel-19 com o gene *B-Raf* mutado, Sk-Mel-28 com os genes *Tp53* e *B-Raf* mutados e Sk-Mel-103 com o *N-Ras* mutado.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do benzotiazol (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol em linhagens celulares de melanoma;
- Avaliar a atividade anticlonogênica do benzotiazol (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol sobre linhagens celulares de melanoma;
- Avaliar o tipo de morte celular causada pela ação do benzotiazol (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol;
- Avaliar o dano ao DNA causado pela ação do benzotiazol (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol em linhagens celulares de melanoma maligno.
- Avaliar a inibição da capacidade de migração e invasão pelo benzotiazol (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol sobre linhagens celulares de melanoma maligno.

4 METODOLOGIAS

4.1 Delineamento Experimental

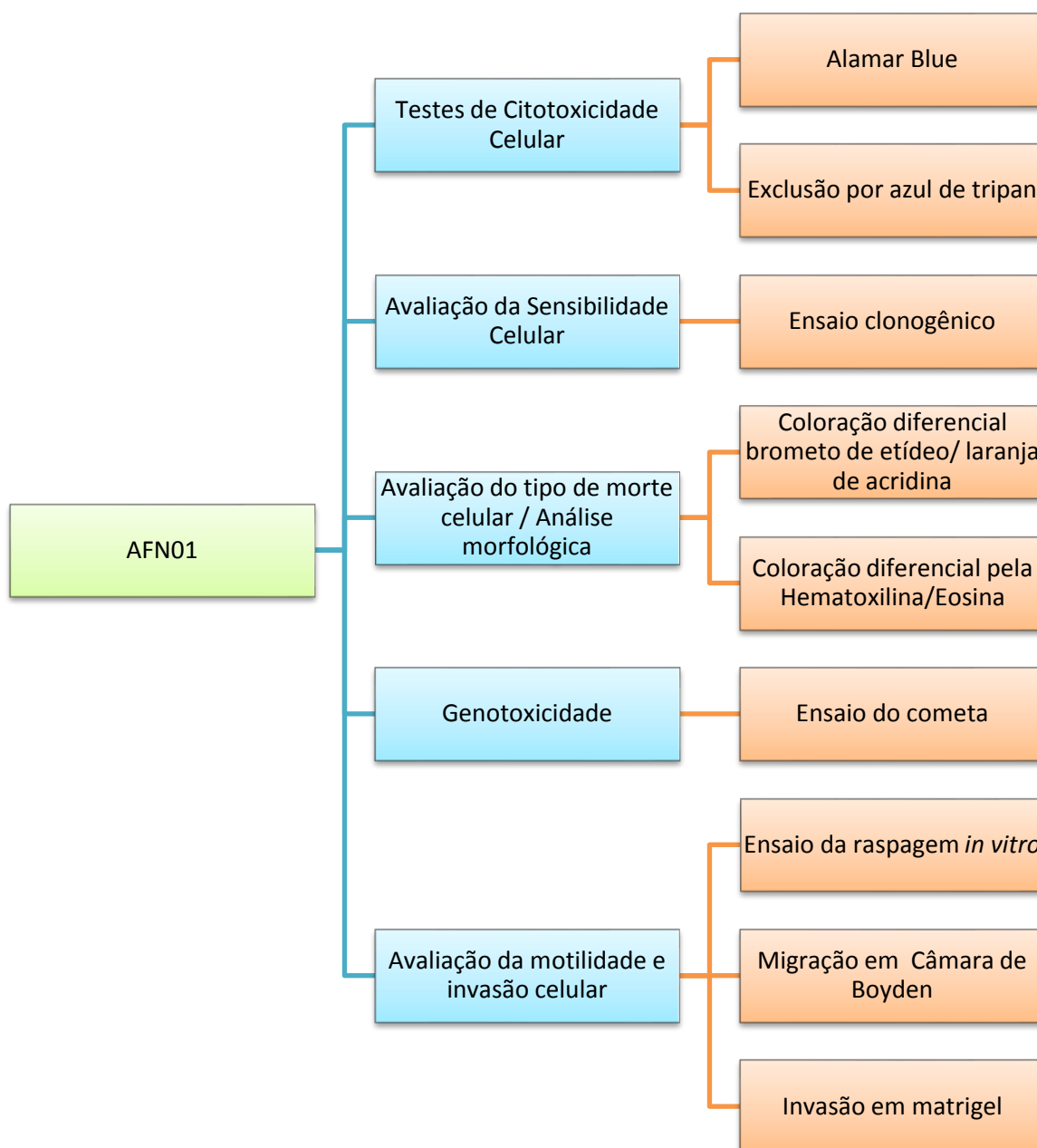


Figura 12 – Delineamento experimental

4.2 Objeto de estudo

Para a realização deste trabalho utilizou-se um derivado (*E*)-2-Benzotiazol Hidrazona, o (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol (AFN01), gentilmente cedido pela equipe da Profa. Dra. Thatyana Rocha Alves Vasconcelos, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense – UFF. A estrutura do derivado benzotiazólico encontra-se a seguir:

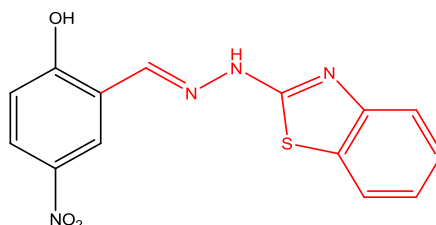


Figura 13 – Estrutura do (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol, derivado (*E*)-2-Benzotiazol Hidrazona

4.3 Linhagens celulares

Foram utilizadas células de melanomas humanos metastáticos SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-103 obtidos a partir de cultura primária gentilmente doadas pela Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler da Universidade de São Paulo (USP).

Tabela 5 – Linhagens de melanoma metastático humano que serão utilizadas no projeto.

Celltype/ Line	p53	p53 induzido	p14 (RNAm)	p16 (RNAm)	B-RAF (V ⁵⁹⁹ E)	N-Ras (éxon 3)	Apaf-1 (prot)	Casp8 (prot)	Bcl-2 (prot)	Bcl-xL (prot)	Mcl1 (prot)
SK-Mel-19	wt	+	+	+ ^{***}	mutant	Wt	++	++	+++	++	
SK-Mel-28	R273H ^R	-*	ND	+ ^{***}	mutant	Wt	-/+	++	++	++	++
SK-Mel-103	wt ^R	+	+	+	wt	Q61R	-	+	++	+++	+++

Legenda:

- wt: *wild-type* (selvagem);
- RNAm: RNA mensageiro;
- ND: não detectado;
- prot.: proteína;
- p53 R273H: mutação *hot spot* da proteína, resultando na substituição de arginina por histidina no códon 273. Esta mutação ocasiona ganho de função, por perda de funções supressoras de tumor e aquisição de novas atividades oncogênicas;
- B-RAF (V599E): mutação ocasionada pela substituição de timina por adenina, no códon 1796 (A1796T), resultando na substituição de valina por ácido glutâmico no códon 599;
- N-Ras (éxon 3) Q61R: mutação majoritariamente no códon 61, presente no éxon 3, ocasionada pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 182 (A182G), que resulta na substituição de glutamina por arginina.

Fonte: Adaptado de Santos, 2011.

4.3.1 Manutenção das células

As células foram cultivadas em DMEM acrescido de 10 % de SFB, 1 % de penicilina e 1 % de estreptomicina. Todas as células foram incubadas a 37 °C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. A confluência foi verificada através da visualização em microscópio invertido e o meio foi trocado sempre que houve mudança em sua coloração decorrente da mudança de pH e consumo do meio pelas células.

4.4 Avaliação da Citotoxicidade Celular

4.4.1 Ensaio do Alamar Blue

Este ensaio consiste na adição de um composto fluorogênico redox, o alamar blue, ao meio de cultura das células cultivadas. A forma oxidada do alamar blue, a rezasurina, possui cor azul escura e fluorescência intrínseca limitada. Em células viáveis, a rezasurina é reduzida a resofurina, a qual emite cor rosa, altamente fluorescente. Acredita-se que esse processo de redução seja mediado por enzimas mitocondriais, citosólicas e microssomais. Em células não viáveis a resazurina permanece na sua forma oxidada de coloração azul escura. A extensão da conversão de resazurina a resofurina reflete a viabilidade celular e pode ser quantificada pela leitura da fluorescência emitida em leitor de microplaca com filtro de excitação de 465 nm e emissão de 540 nm (NAKAYAMA *et al*, 1997).

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed e colaboradores (1994). Em placa de 96 poços, as células (Sk-Mel-19, S-Mel-28, Sk-Mel-103) foram semeadas na concentração de $1,0 \times 10^4$ células por poço. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações de AFN01 (0-10 μ M). A doxorubicina e a dacarbazina foram usadas como controle positivo (0-10 μ M). O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração das soluções teste. Passado tempo de tratamento determinado (24/48/72 h), 10 μ L da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4%, 1:20, em meio de cultura sem soro fetal bovino) foi adicionado a cada poço da placa e após 3 h de exposição

ao Alamar Blue, retirando da estufa meia hora antes do término, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de placas de elisa (DTX800 Beckman e Coulter).

4.4.2 Exclusão por Azul de Tripan

Este ensaio baseia-se na capacidade que o corante azul de tripan tem de penetrar em todas as células. No entanto, células viáveis conseguem expulsar o corante enquanto células não-viáveis permanecem coradas (PERES & CURI, 2005).

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão por corante Azul de Tripan 0,4 % em PBS (FRESHNEY, 1987), no qual as células foram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentaram a coloração azul em seu interior. Para a realização do ensaio, as células foram semeadas na densidade $1,5 \times 10^4$ células por poço em placas de 24 poços. Decorridas 24 h, o meio foi retirado e, então adicionou-se diferentes concentrações de AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μM). A doxorubicina e a dacarbazina (5,0 μM) foram usadas como controle positivo e o DMSO como controle negativo. Após o período de tratamento determinado (24/48/72h) as células foram colhidas e centrifugadas a 1500rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células ressuscitado com 90 μL de meio DMEM completo, aos quais foram adicionados 10 μL de Tripan Blue. Decorridos 2 minutos, 10 μL da suspensão de células foi aplicado em uma câmara de Neubauer e foram contadas as células viáveis e as não-viáveis.

4.5 Avaliação da sensibilidade celular

4.5.1 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico foi primeiramente descrito na década de 60 por radiologistas que desejavam avaliar a radiosensibilidade de linhagens tumorais *in vitro*. Posteriormente foi adaptado para a avaliação de drogas para fornecer dados a respeito da integridade estrutural e funcional das células tratadas, podendo evidenciar algum efeito citotóxico/citostático através da avaliação do tempo de recuperação da célula pós-tratamento medido em função do número de colônias formadas e do número de células em cada colônia celular (PLUMB, 2003).

Para este ensaio realizou-se metodologia de acordo com Plumb (2003). Em placas de 6 poços foram semeadas 400 células/poço e, após 24h do plaqueamento, realizou-se o tratamento em triplicata com diferentes concentrações de AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μM) definidas após os testes de citotoxicidade. O crescimento das colônias foi observado durante 7-10 dias, período no qual a placa permaneceu sob condições de cultivo ideais.

Após esse período as células foram fixadas com metanol e coradas com cristal violeta. O número de colônias foi quantificado e os resultados das triplicatas comparados por análise de variância Oneway com pós teste de Tukey. O efeito citotóxico foi observado pela redução no número de colônias e o efeito citostático pela redução no número de células em cada colônia.

4.6 Avaliação do tipo de morte celular

4.6.1 Coloração diferencial pelo Brometo de Etídio (BE)/Acridina Laranja (AO)

A indução de apoptose, originalmente descrita como uma morfologia peculiar de morte celular fisiológica ou programada (KERR et al., 1972), e de necrose, caracterizada como uma morte celular onde há perda precoce da integridade da membrana plasmática (SQUIER et al., 2001) foi avaliada pela coloração diferencial de BE/AO, na qual células viáveis possuíam uma coloração verde uniforme em seu núcleo; células em apoptose inicial possuíam pontos de cromatina condensada corados em verde brilhante; células em apoptose tardia possuíam pontos de cromatina corados em verde brilhante possivelmente entremeados com resquícios de coloração alaranjada e células em necrose possuíam uma coloração laranja uniforme (CURY-BOAVENTURA et al, 2004).

Para a realização desse ensaio foi necessário o preparo de soluções estoque de BE e AO a 1 mg/ml em solução salina 0,9%. Tais soluções foram estocadas a 4 °C, protegidas da luz, e misturadas na proporção de 1:1 no momento da coloração e leitura (solução de trabalho), que foi toda realizada no escuro (SQUIER et al, 2001).

Para a determinação do tipo de morte celular as células foram cultivadas em placas de 12 poços e tratadas com três concentrações de AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μ M), além do controle negativo, tratado apenas com DMSO 0,1%, e dos controles positivos tratados com doxorubicina e dacarbazina (5,0 μ M). Em seguida, após decorrido o tempo de tratamento, o sobrenadante dos poços foi coletado para um microtubo, assim como as células, que foram soltas por tripsinização.

Uma alíquota de 10 μL dessa suspensão de células foi misturada com 1 μL da solução de trabalho de AO/BE, transferida para uma lâmina, coberto com lamínula e observada em microscópio de fluorescência no aumento de 400x sob filtro de excitação de 360 nm (SQUIER et al, 2001). Trezentas células foram avaliadas e contadas para a triplicata de cada tratamento e posteriormente os resultados obtidos avaliados por análise de variância seguida de pós teste de Tukey.

4.7 Análise morfológica

4.7.1 Coloração diferencial pela Hematoxilina/Eosina

Com o intuito de avaliar a ocorrência de alterações morfológicas causadas pela droga AFN01, as três linhagens de melanoma estudadas (Sk-Mel-19, 28 e 103) foram cultivadas na densidade de $3,0 \times 10^4$ células/ml em placas de 24 poços e tratadas com concentrações definidas, após testes de citotoxicidade, de AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μM), de DMSO 0,1% (controle negativo), e dos controles positivos doxorubicina e dacarbazina (5,0 μM).

O sobrenadante dos poços e as células (após tripsinização) foram coletadas em microtubos, em três tempos distintos, 24, 48 e 72h. Em seguida, a solução foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o pellet ressuspenso em 200 μL de PBS. Após esse processo, uma alíquota de 100 μL foi retirada e centrifugada por 5 minutos a 1000 rpm em citocentrífuga.

Após a centrifugação as células aderidas nas lâminas foram fixadas e coradas com kit corante panótico rápido LaborClin®. As lâminas foram então analisadas em microscópio óptico, para avaliação das alterações morfológicas comparando-se as

células tratadas e não tratadas. O registro das alterações celulares foi realizado por fotografias (VASCONCELLOS et al, 2007).

4.8 Avaliação da genotoxicidade

4.8.1 Teste do Cometa

Danos e mutações no DNA desempenham um papel central nas doenças neoplásicas (SÁNCHEZ et al., 2004). Para avaliar estes danos, o teste do cometa pode ser empregado em qualquer fase do processo neoplásico (SINGH et al., 1988; WOZNIAK et al., 2007; NOSSONI, 2008). Este ensaio baseia-se na lise de membranas celulares e posterior indução da migração eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose. O método trata-se de um ensaio molecular sensível que oferece uma resposta rápida e relativamente simples para detecção de danos no DNA ao nível de células individuais animais e vegetais (RUNDELL et al., 2003; KUMARAVEL et al., 2009).

Neste ensaio a fração de migração de DNA é medida através da visualização de caudas semelhantes a um cometa após eletroforese, e é geralmente aceito que o montante da cauda do DNA está correlacionada com o nível de fragmentação do DNA em uma célula ou, em média, em uma população de células (FOCKE et al., 2010). A análise do teste se dá através da medida do tamanho da cauda (DNA fragmentado) em relação à cabeça do cometa (DNA sem dano). Assim, quatro classes foram estabelecidas (Figura 14): Classe 0 - sem cauda (sem dano ao DNA); Classe 1 - cauda pequena, menor que o diâmetro da cabeça; Classe 2 - comprimento da cauda uma a duas vezes maior que o diâmetro da cabeça; Classe 3

- cauda com tamanho superior a duas vezes o diâmetro da cabeça; Classe 4: cauda longa e espalhada em forma de leque, as vezes quase sem cabeça. A partir do teste também torna-se possível inferir fragmentação apoptótica do DNA em células cujo nucleóide não se mostra denso e apresenta-se difuso, ao contrário da célula sem dano, em que o material nuclear está compacto (OLIVE e BANATH, 1995).

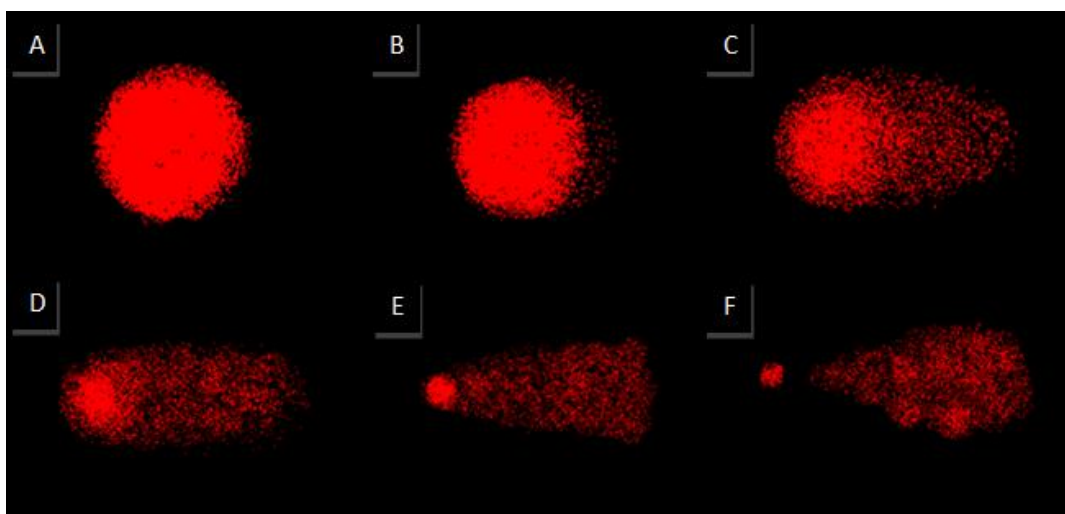


Figura 14 – Diferentes graus de dano no DNA avaliados pelo teste do cometa: a) Grau 0; b) Grau 1; c) Grau 2; d) Grau 3; e) Grau 4; f) Célula apoptótica.

Fonte: Arquivo do Laboratório de Atividade Biológica – BIOPHAR/PPGCF/UFAM.

O teste do cometa foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Singh (1988), com algumas modificações. Para o controle positivo utilizou-se doxorrubicina e para controle negativo, o diluente. As linhagens escolhidas foram plaqueados em placas de 24 poços na concentração de $5,0 \times 10^5$ células por poço em 2 ml de meio DMEM completo. A placa foi incubada em atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C por 24 h e, após esse período, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μM), DMSO 0,1%, doxorrubicina (5,0 μM) e dacarbazina (5,0 μM) durante 3 h. Em seguida, 20 μL destas células foram adicionados a 90 μL de agarose de baixo ponto de fusão e este total colocado em lâminas de microscopia pré-cobertas com agarose de ponto de fusão normal. Esta

pré-cobertura foi realizada com a agarose a 60°C, e as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 24 h até a solidificação da agarose.

As lâminas contendo a solução de células mais agarose foram cobertas com lamínulas para uniformizar a distribuição do material e foram mantidas a 4°C para solidificação da agarose. Após a solidificação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas ficaram em uma solução de lise (solução-mãe de lise com 10 % de DMSO e 1 % de Triton-X 100) por 1 h, para que ocorresse a desnaturação da parede celular e nuclear, restando o DNA ocupando o espaço que antes era o núcleo da célula. As lâminas foram retiradas da solução de lise e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese a qual foi preenchida com tampão de corrida por 20 minutos para permitir o desempacotamento do DNA. A eletroforese foi conduzida em banho de gelo e na ausência de luz por 20 min, a 20 V e com corrente de 300 mA. Após a eletroforese as lâminas, foram retiradas e submetidas a 3 lavagens de 5 minutos com solução de neutralização para retirada da alcalinidade das lâminas. Em seguida, foram fixadas em etanol P.A e, posteriormente, 40 µL da solução de Brometo de Etídio (20 µg/ml) foram aplicados sobre as lâminas cobrindo-as com lamínula, sendo analisadas em microscópio de fluorescência.

Foram analisados e contados 50 cometas/lâmina, sendo classificados de acordo com a porcentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA. A análise dos cometas foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda.

A análise dos dados deu-se a partir da média e desvio padrão da média da triplicata. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey, com nível de significância de 5 % ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 5.0

para a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos.

4.9 Avaliação da motilidade e invasão celular

4.9.1 Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular *in vitro*

O ensaio de raspagem celular *in vitro*, é um ensaio simples, bem desenvolvido e de baixo custo. Descrito por Liang e colaboradores (2007), o teste é capaz de fornecer dados a respeito da migração celular *in vitro* de células que crescem aderidas. O ensaio necessita de etapas básicas que envolvem: a raspagem de uma região da monocamada celular criando um “arranhão”, provocando então uma descontinuidade na camada de células antes homogênea ($\pm 70\%$ de confluência); e, o acompanhamento do comportamento e captura de imagens da região “arranhada” a intervalos regulares.

Assim, para a realização deste ensaio, as células foram cultivadas em placas de 06 poços numa densidade de 15×10^4 /ml, e levadas a incubação durante 24 horas. Após esse período foi feito o “arranhão”, as células foram tratadas com diferentes concentrações de AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μM), DMSO 0,1%, doxorubicina e dacarbazina (5,0 μM). O comportamento das células foi observado e fotografado durante um período de 72 horas.

A inibição da migração das células em direção a região raspada *in vitro* mimetiza a inibição do processo de migração *in vivo* e fornece dados iniciais sobre a interferência da droga no processo metastático típico de tumores malignos (LIANG et al, 2007).

4.9.2 Migração vertical, utilizando câmara de Boyden

A câmara de Boyden é uma ferramenta útil para estudar a migração e invasão celular. O teste consiste em plaquear a célula de interesse dentro de um inserto apoiado sobre o poço de uma placa de cultura de células. O inserto possui seu fundo formado por uma membrana de policarbonato, com poros em quantidade e diâmetros definidos.

As células são plaqueadas em cima do inserto em meios isentos de soro, enquanto quimioatrativos, soro ou semelhantes são colocados no poço abaixo do inserto. Células que possuem a capacidade de migrar movem-se através dos poros em direção ao quimioatraente abaixo e podem ser marcadas ou quantificadas em um leitor de placas. Células invasoras podem ser mensuradas de forma semelhante por meio da colocação de um revestimento de proteínas de matriz extracelular na parte superior da membrana de policarbonato do inserto. Deve-se observar a diferença entre quimiotaxia, na qual a migração das células se dá pela afeição pelos produtos químicos que se encontram em seu meio ambiente, podendo ocorrer a migração de células para perto ou para longe de um sinal químico particular e, haptotaxia onde ocorre a migração de células ao longo de um gradiente de matriz extracelular.

Esta metodologia foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Lochter et al. (1997). Os insertos com poros de $8\mu\text{M}$ (BD), adicionados em placa de 24 poços. Em seguida, foram plaqueadas sobre os insertos $5,0 \times 10^4$ células de melanoma/200 μL de DMEM sem soro e serão adicionados 300 μL de meio à câmara inferior. Realizou-se o tratamento em triplicata com diferentes concentrações de AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μM). Como controle positivo, foi utilizado o DMEM com

10% de SFB na câmara inferior. Após 24 horas, o meio de cultura da câmara inferior foi aspirado e as células foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBSA por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a câmara inferior foi lavada três vezes com água destilada e, por fim, as células foram coradas com solução de 0,5% azul de toluidina em 2% de Na₂CO₃, por 20 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi retirado através de três lavagens com água destilada e, por fim, as células que permanecerem na câmara de Boyden foram removidas com auxílio de uma haste com algodão. As células que atravessaram os poros dos inestros, localizadas na superfície inferior da câmara de Boyden, foram visualizadas em microscópio invertido, utilizando-se aumento de 200 vezes.

4.9.3 Invasão em matrigel, utilizando câmara de Boyden

O matrigel é uma preparação de membrana solubilizada extraída do sarcoma de EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) do rato, um tumor rico em proteínas da matriz extracelular, possuindo a laminina como seu maior componente, além de fatores de crescimento, que ocorrem naturalmente nesse tumor. O matrigel visa fornecer substrato suficiente para o estudo da angiogênese tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KEMPTON et al., 2009).

Esta metodologia foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Lochter et al. (1997). Os insertos com poros de 8µM (BD), adicionados em placa de 24 poços, foram recobertos com 20 µL de Matrigel (BD) diluído em 1:6 em DMEM sem soro (cerca de 2-3mg/ml de proteína) e incubados por 30 minutos em estufa de CO₂, a 37° C. Em seguida, foram plaqueadas sobre o Matrigel 5,0 X10⁴ células de melanoma/200 µL de DMEM sem soro e serão adicionados 300 µL de meio à

câmara inferior. Realizou-se o tratamento em triplicata com diferentes concentrações de AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μM). Como controle positivo, foi utilizado o DMEM com 10% de SFB na câmara inferior. Após 24 horas, o meio de cultura da câmara inferior foi aspirado e as células foram fixadas em formaldeído 3,7% em PBSA por 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a câmara inferior foi lavada três vezes com água destilada e, por fim, as células foram coradas com solução de 0,5% azul de toluidina em 2% de Na_2CO_3 , por 20 minutos à temperatura ambiente. O excesso de corante foi retirado através de três lavagens com água destilada e, por fim, as células que permanecerem na câmara de Boyden foram removidas com auxílio de uma haste com algodão. As células que invadiram o Matrigel, localizadas na superfície inferior da câmara de Boyden, foram visualizadas em microscópio invertido, utilizando-se aumento de 200 vezes.

4.10 Análise estatística

Os resultados foram analisados e comparados por análise de variância *Oneway* (ANOVA) seguida por Teste de Tukey e, *Oneway* (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni no ensaio de Laranja acridina/Brometo de etídeo, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) no programa GraphPad Prism versão 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da Citotoxicidade Celular

5.1.1 Ensaio do Alamar Blue

A atividade citotóxica da AFN01 foi avaliada pelo método do Alamar Blue e os resultados estão representados na tabela 6. A AFN01 mostrou-se inespecífica e com citotoxicidade variando entre 6,02 μM e menor que 10 μM no tempo de 24 horas, 5,07 μM e menor que 10 μM no tempo de 48 horas e, 4,72 μM e menor que 10 μM no tempo de 72 horas.

Tabela 6 – CI50 em μM de AFN01, dacabazina e doxorubicina em células de melanoma metastático humano por Alamar Blue.

LINHAGEM	AFN01			Doxorrubicina (controle positivo)			Dacarbazina (droga referência)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
SKMEL 19	9,91 (6,92- 14,20)	5,07 (4,23-6,75)	4,87 (4,12- 5,76)	>10	4,61 (3,61- 5,87)	2,93 (2,57-3,35)	>100	>100	>100
SKMEL 28	6,02 (4,96 – 7,29)	5,47 (4,53 - 6,61)	4,72 (4,09- 5,44)	>10	>10	4,52 (3,73-5,47)	>100	>100	>100
SKMEL 103	>10	>10	>10	>10	1,87 (1,36 - 2,57)	1,12 (0,99 – 1,26)	>100	>100	>100

5.1.2 Exclusão por Azul de Tripan

No ensaio de Azul de Tripan a AFN01 foi efetiva ao diminuir a viabilidade celular das células Sk-Mel-19, 28 e 103 (figuras 15, 16 e 17), apresentando uma diminuição do quantitativo de células vivas, quando comparadas na mesma concentração, superior a doxorrubicina (figuras 15 e 16), exceto na SK-Mel-103 e no tempo de 72 horas da SK-Mel-28 (figuras 16 e 17). O efeito da AFN01 sobre o quantitativo de células mortas não diferiu dos controles negativo e positivos.

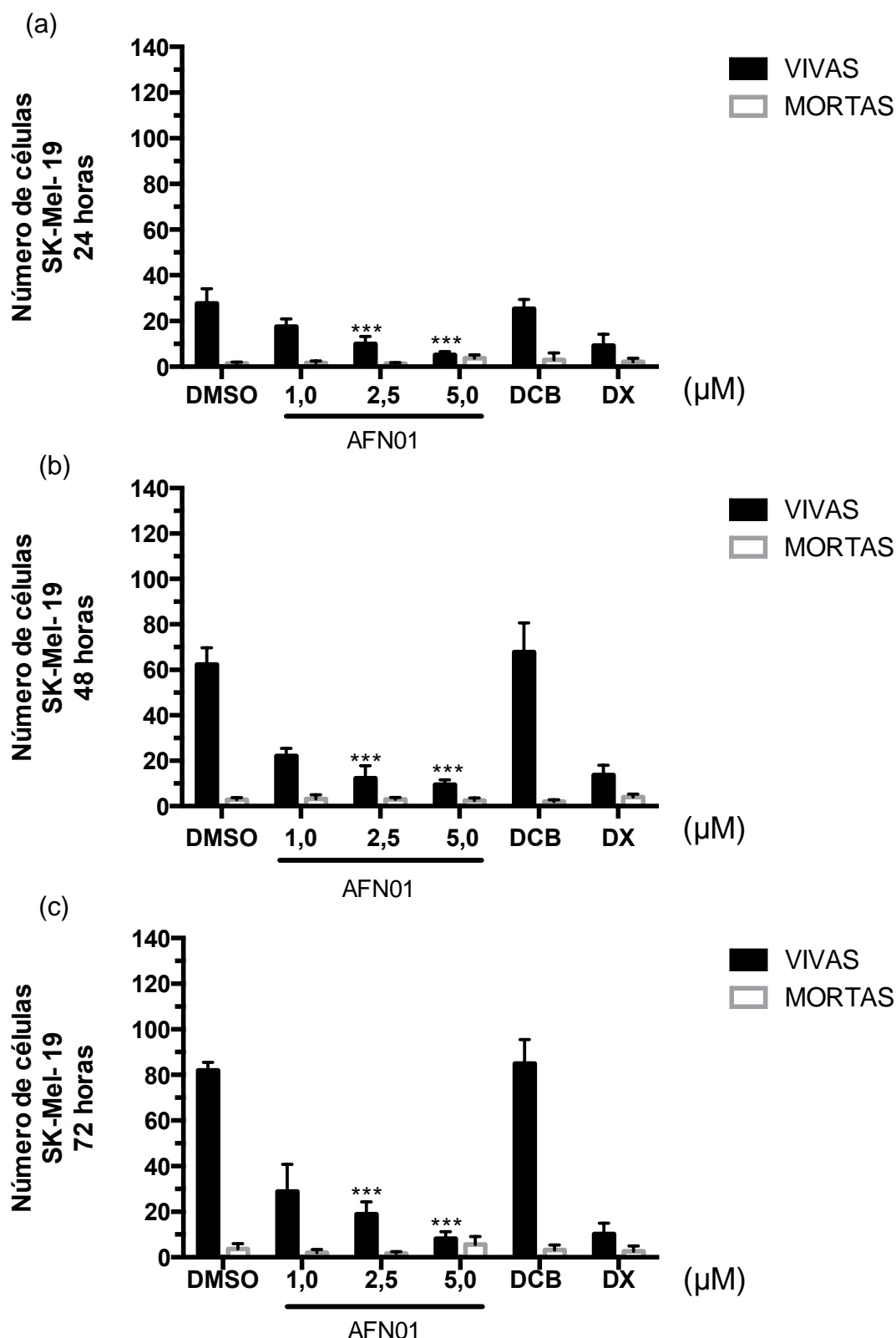


Figura 15 – Análise de viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán – Quantificação de morte celular pela AFN01 (1,0; 2,5 e 5,0 μM) na linhagem celular de melanoma humano metastático SK-MEL-19 após incubação de 24 h (a), 48 h (b) ou 72 h (c). DMSO 0,1% foi usado como controle negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados ($n=6$). *** $p<0,001$ comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

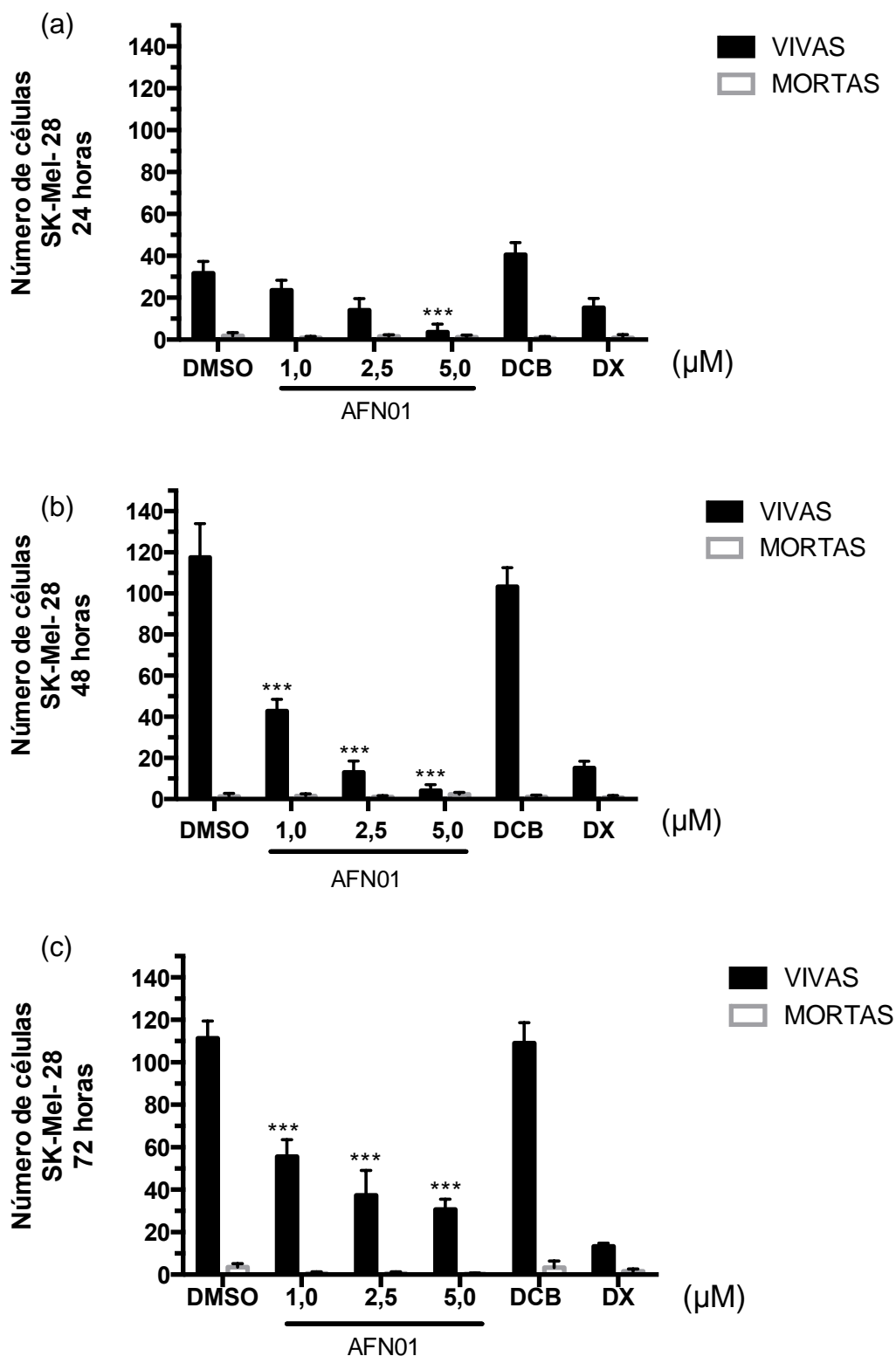


Figura 16 – Análise de viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán – Quantificação de morte celular pela AFN01 (1,0; 2,5 e 5,0 μM) na linhagem celular de melanoma humano metastático SK-MEL-28 após incubação de 24 h (a), 48 h (b) ou 72 h (c). DMSO 0,1% foi usado como controle negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados (n=6). *** $p < 0,001$ comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

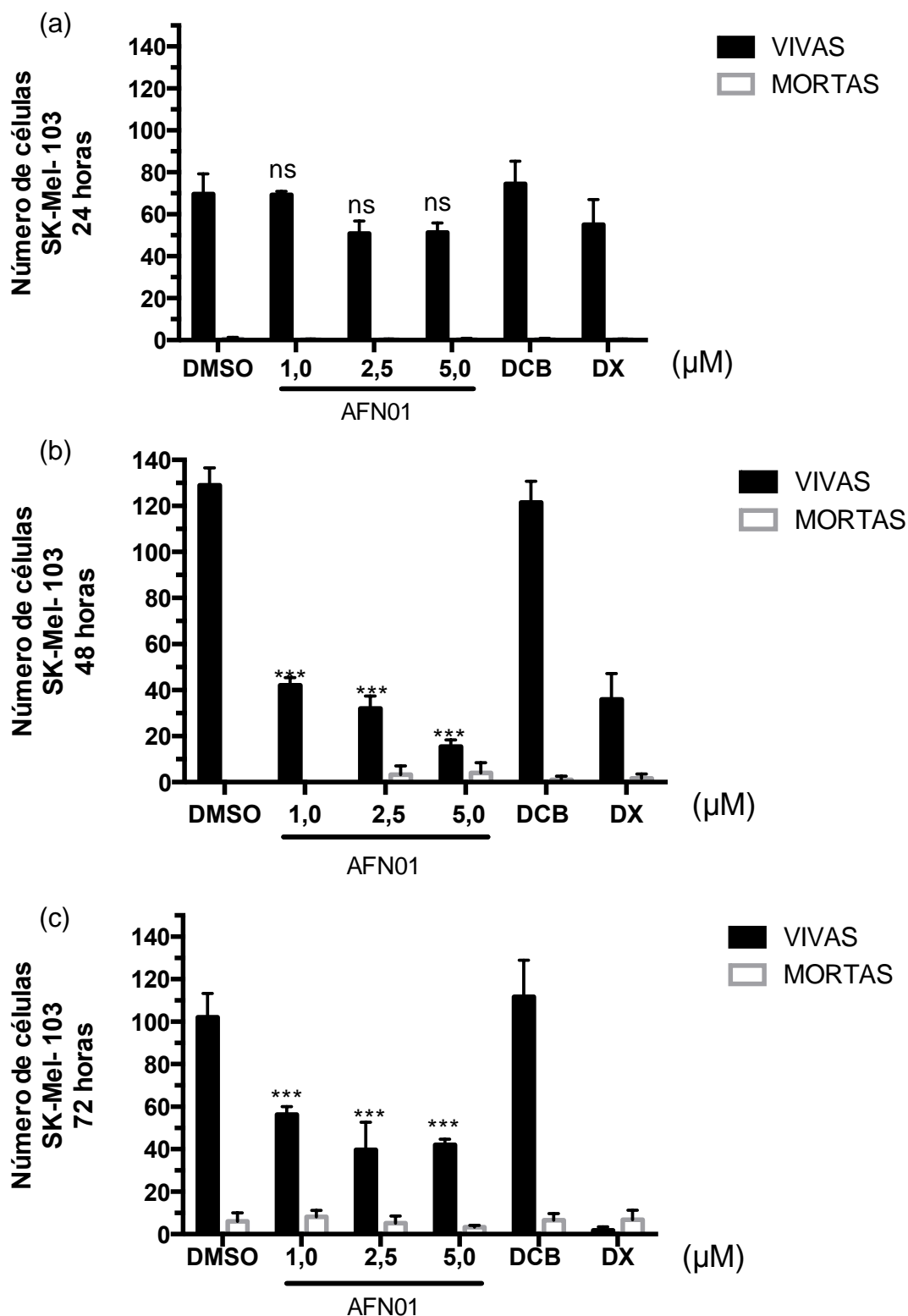


Figura 17 –Análise de viabilidade celular – Exclusão por Azul de Tripán – Quantificação de morte celular pela AFN01 (1,0; 2,5 e 5,0 μM) na linhagem celular de melanoma humano metastático SK-MEL-103 após incubação de 24 h (a), 48 h (b) ou 72 h (c). DMSO 0,1% foi usado como controle negativo. Doxorubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μM). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados (n=6). *** $p < 0,001$ comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

5.2 Avaliação da sensibilidade celular

5.2.1 Ensaio clonogênico

A linhagem de SK-Mel-28 teve marcadamente uma redução na sobrevivência clonogênica, apresentando uma média de formação de 22 colônias na menor concentração (1,0 μM) e zero colônias formadas na maior concentração (5,0 μM) de AFN01 utilizada, quando comparada com o controle negativo que apresentou uma média de 228 colônias formadas (letras **c** e **d** da figura 18). A AFN01 inibiu a linhagem de SK-Mel-103 na maior concentração testada (5,0 μM) de, resultando na formação, média, de 4 colônias em relação às 26 colônias formadas no controle negativo (letras **e** e **f** da figura 18). AFN01 não demonstrou ação inibitória sobre a capacidade clonogênica da célula SK-Mel-19 (letras **a** e **b** da figura 18).

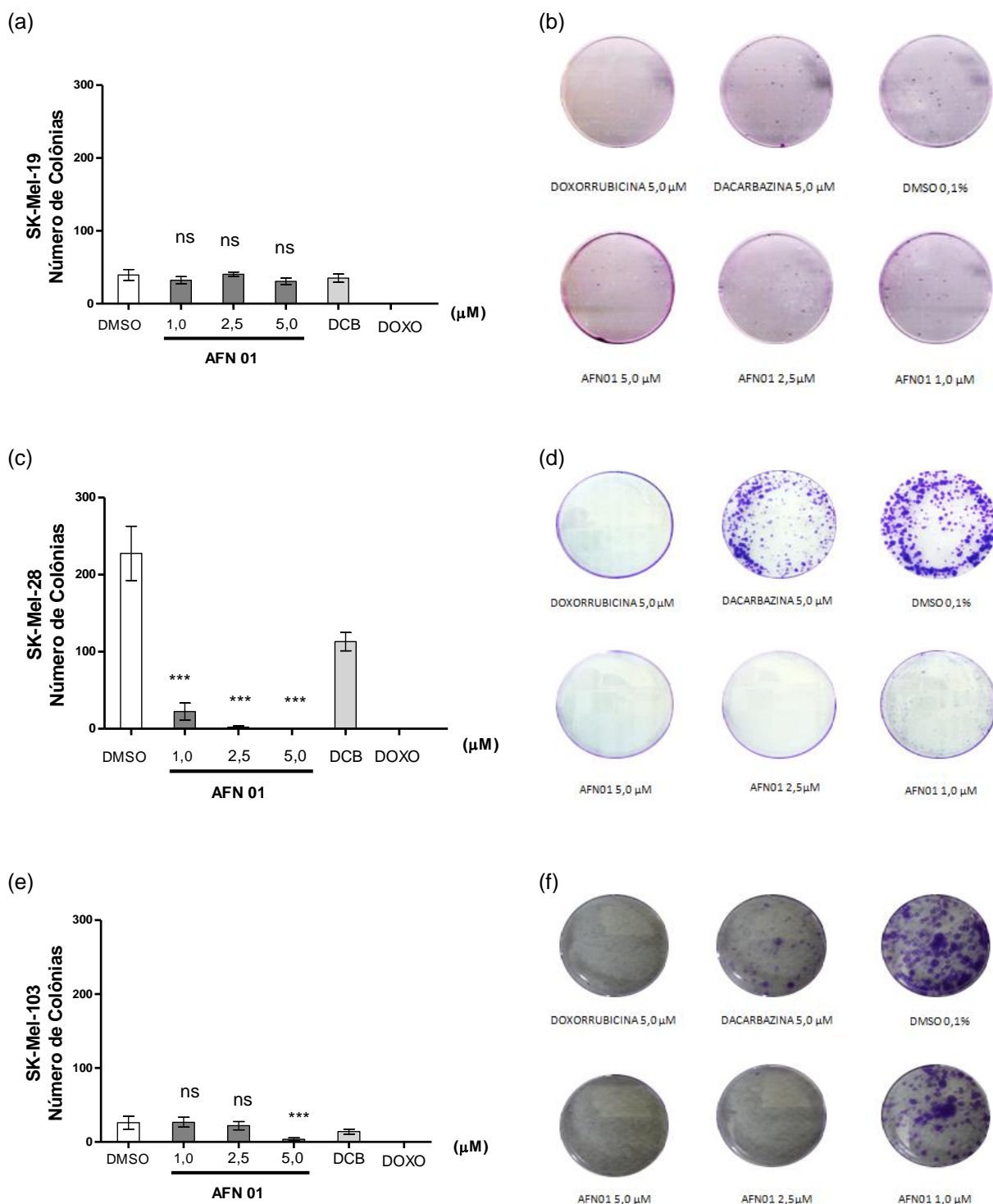


Figura 18 – Ensaio Clonogênico mostrando os efeitos em sete (07) dias do tratamento com AFN01 sobre células de câncer de pele melanoma. a) e b) Células SK-Mel-19 tratadas com DMSO, doxorubicina, dacarbazina ou AFN01 por um período de 168 h; c) e d) Células SK-Mel-28 tratadas com DMSO, doxorubicina, dacarbazina ou AFN01 por um período de 168h; e) e e) e f) Células SK-Mel-103 tratadas com DMSO, doxorubicina, dacarbazina ou AFN01 por um período de 168h. Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). **p<0,01,*** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

5.3 Avaliação do tipo de morte celular

5.3.1 Coloração diferencial pelo Brometo de Etídio (BE)/Acridina Laranja (AO)

A morfologia das células tratadas foi investigada usando corante Laranja de Acridina / Brometo de Etídio (LA/BE) através de microscopia de fluorescência. Calculou-se a percentagem de células viáveis, células em apoptose e células necróticas. Uniformemente células verdes com morfologia normal foram observadas no grupo controle, atingindo 90% das células quantificadas. Células tratadas com AFN01 mostraram um aumento do número de células em apoptose, nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM , sendo que no tempo de 24 horas o aumento de células apoptóticas na amostra tratada AFN01 5,0 μM foi de dez (10) vezes a do controle. No período de 72 horas, apenas nas concentrações mais elevadas (5,0 μM) foram encontradas células necróticas, além disso, células SK-Mel-28 e SK-Mel-103 tratadas com doxorrubicina e dacarbazina também apresentaram características apoptóticas. Células SK-Mel-19 tratadas com doxorrubicina apresentaram células com características necróticas e as tratadas com dacarbazina apresentaram características apoptóticas (Figuras 19, 20 e 21).

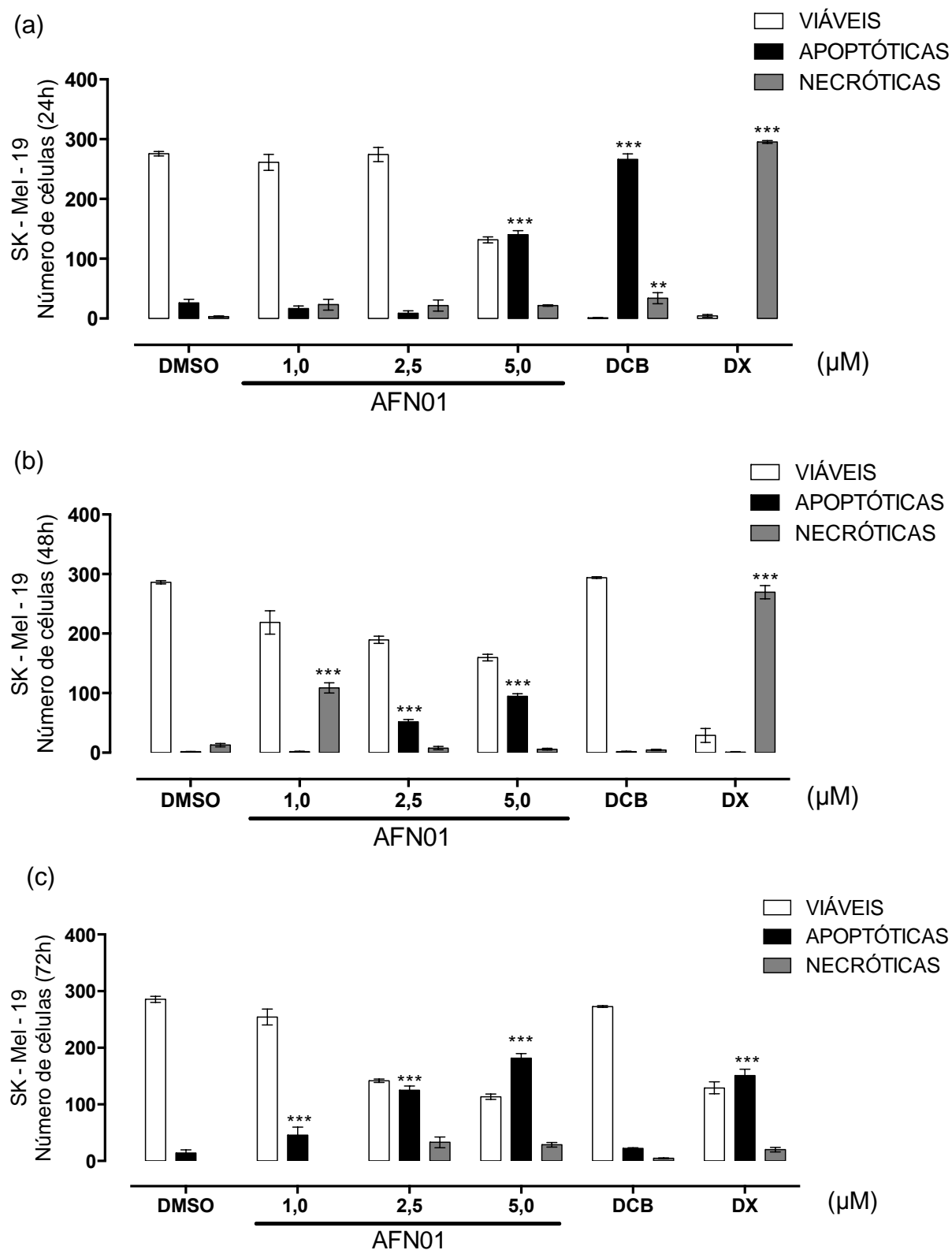


Figura 19 – Determinação da viabilidade das células pelo laranja de acridina e brometo de etídio (LA / BE) coloração de células SK-MEL-19 tratadas com AFN01 usando microscopia de fluorescência. DMSO foi usado como controlo negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controlo positivo (5,0 μM). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em duplicata (n = 6).**p<0,001,***p<0,001 comparado ao controlo pelo teste de ANOVA seguido de Bonferroni.

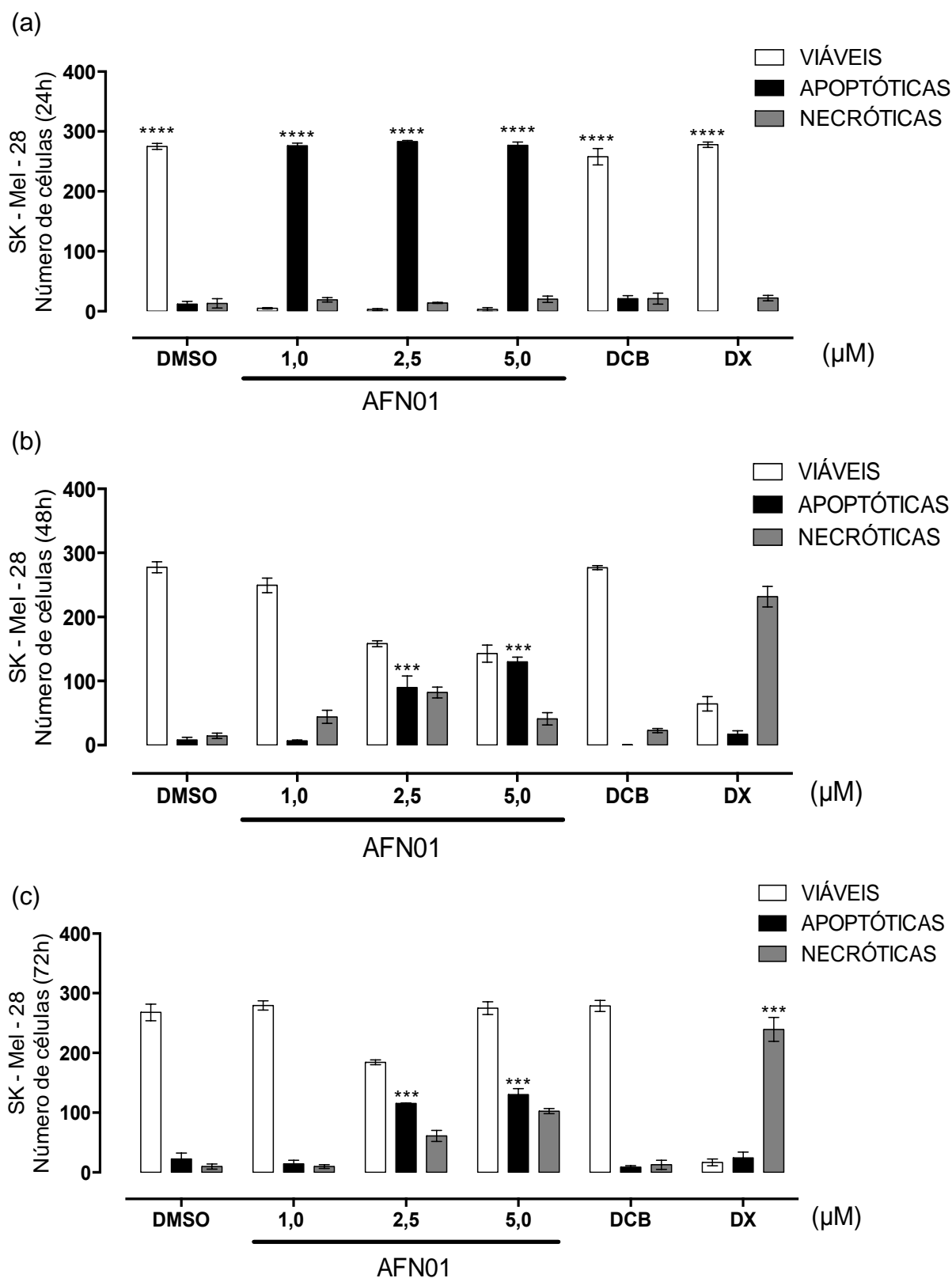


Figura 20 – Determinação da viabilidade das células pelo laranja de acridina e brometo de etídio (LA / BE) coloração de células SK-MEL-28 tratadas com AFN01 usando microscopia de fluorescência. DMSO foi usado como controle negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controle positivo (5,0 μM). Os dados são apresentados como média ± desvio de padrão de três experimentos independentes em duplicata (n = 6).**p<0,001, ***p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Bonferroni.

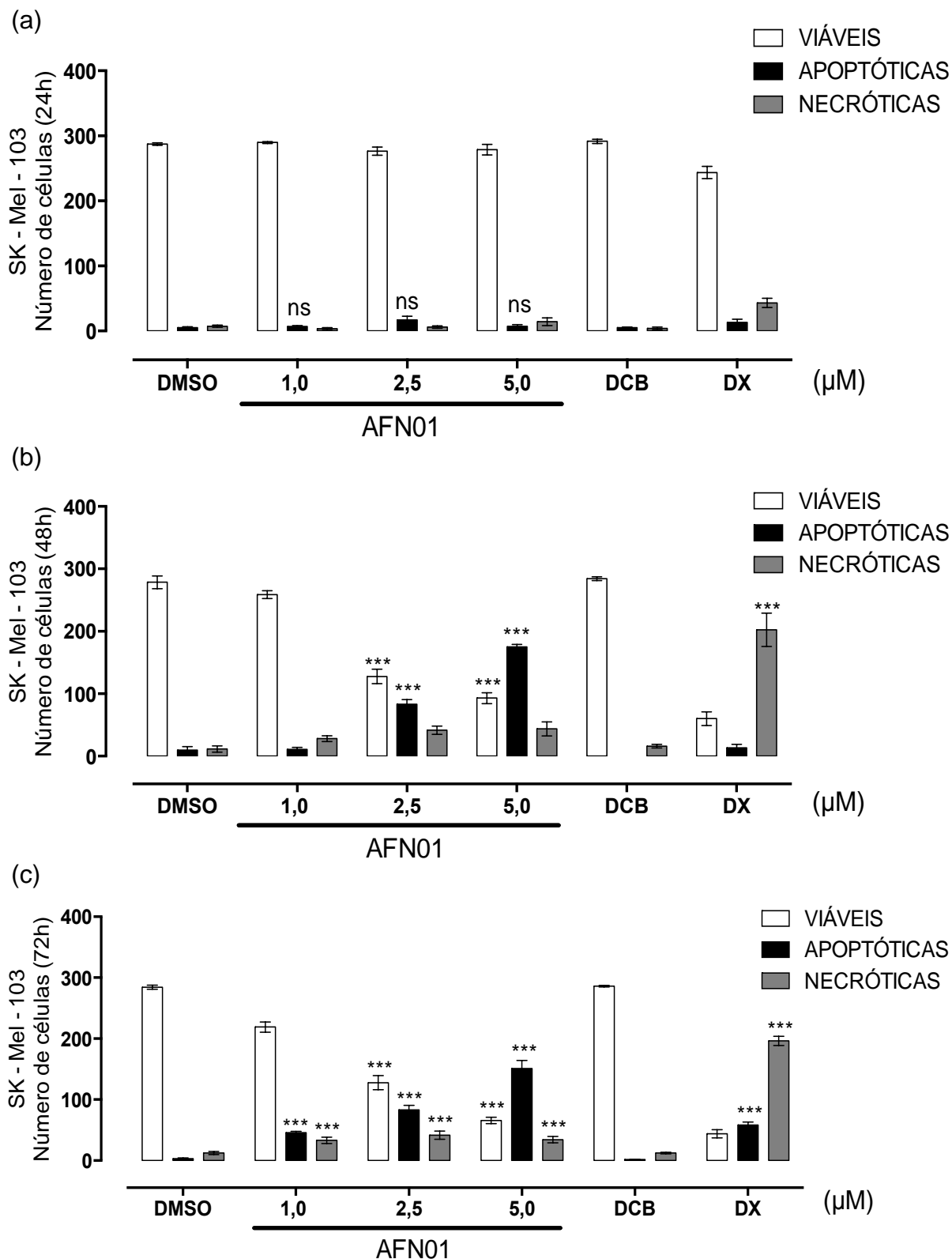


Figura 21 – Determinação da viabilidade das células pelo laranja de acridina e brometo de etídio (LA / BE) coloração de células SK-MEL-103 tratadas com AFN01 usando microscopia de fluorescência. DMSO foi usado como controlo negativo. Doxorrubicina e dacarbazina foram utilizados como controlo positivo (5,0 μM). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos independentes em duplicata (n = 6).**p<0,001,*** p<0,001 comparado ao controlo pelo teste de ANOVA seguido de Bonferroni.

5.4 Análise morfológica

5.4.1 Coloração diferencial pela Hematoxilina/Eosina

A análise morfológicas das células SK-Mel, revelou alterações ocasionadas pela AFN01, quando comparadas com as células não tratadas (figuras 22, 23 e 24). Todas as concentrações testadas com AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μM), apresentaram algum tipo de alteração, sugestivas de apoptose, entre elas, vacúolos intracelulares, formação de “bleebings”, afrouxamento da cromatina, pontos de condensação nuclear, halos perinucleares, nucléolos, cariorrexi e cariólise.

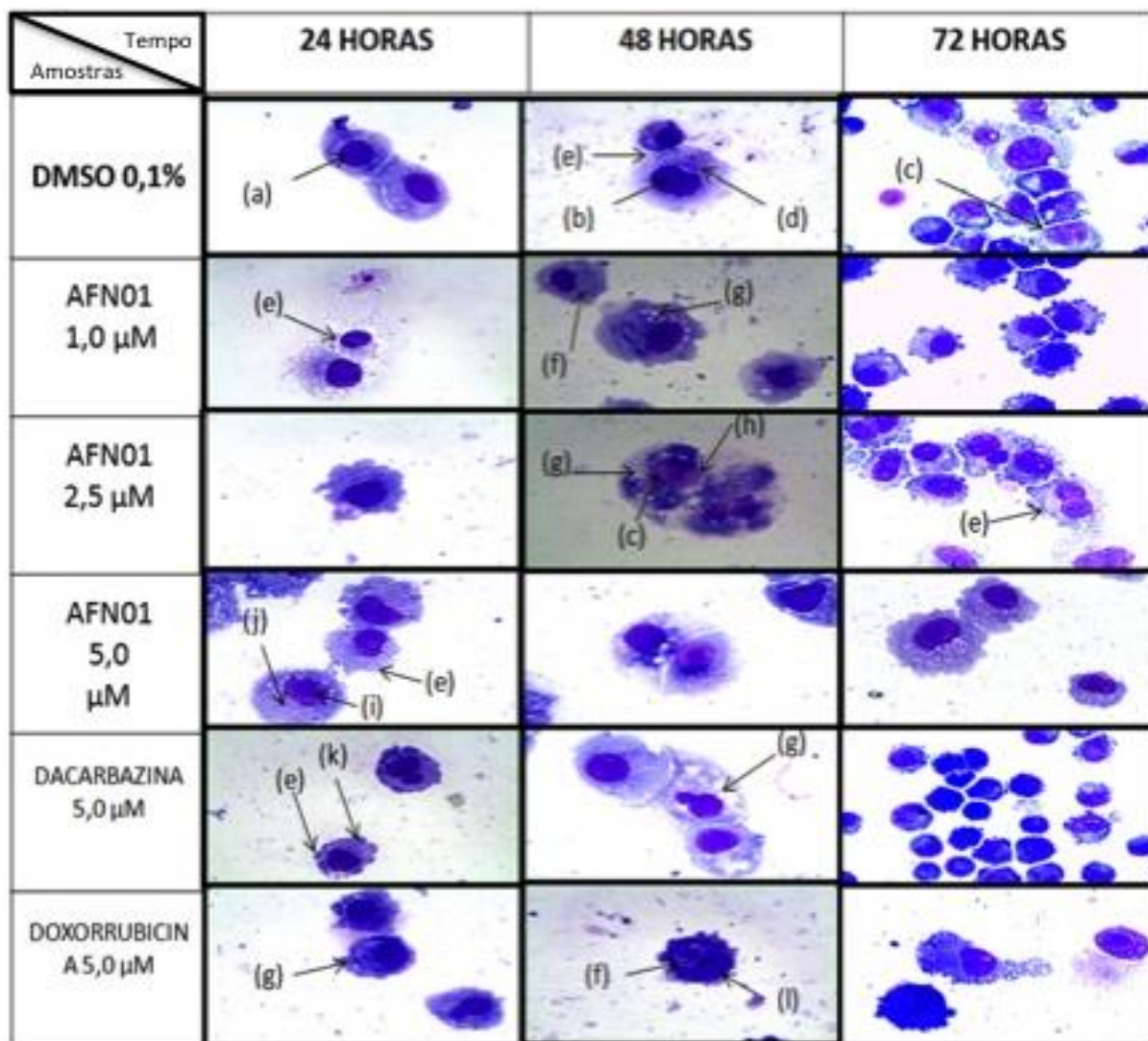


Figura 22 – Ensaio de Avaliação Morfológica Hematoxilina / Eosina – SK- Mel – 19. Ensaio de Avaliação Morfológica Hematoxilina / Eosina – SK- Mel – 19. Núcleos basofílicos (a), com pontos de condensação de cromatina (b), nucléolos (c), citoplasma basofílico e finamente granular (d), lise celular (e) intensa lise citoplasmática representado por pequenas vesículas que se desprendem (e), halos perinucleares (f), vacúolos citoplasmáticos (g), anofilia nuclear (h), afrouxamento da cromatina (i) e anofilia citoplasmática (j), citoplasma granular (k), basofília citoplasmática (l).

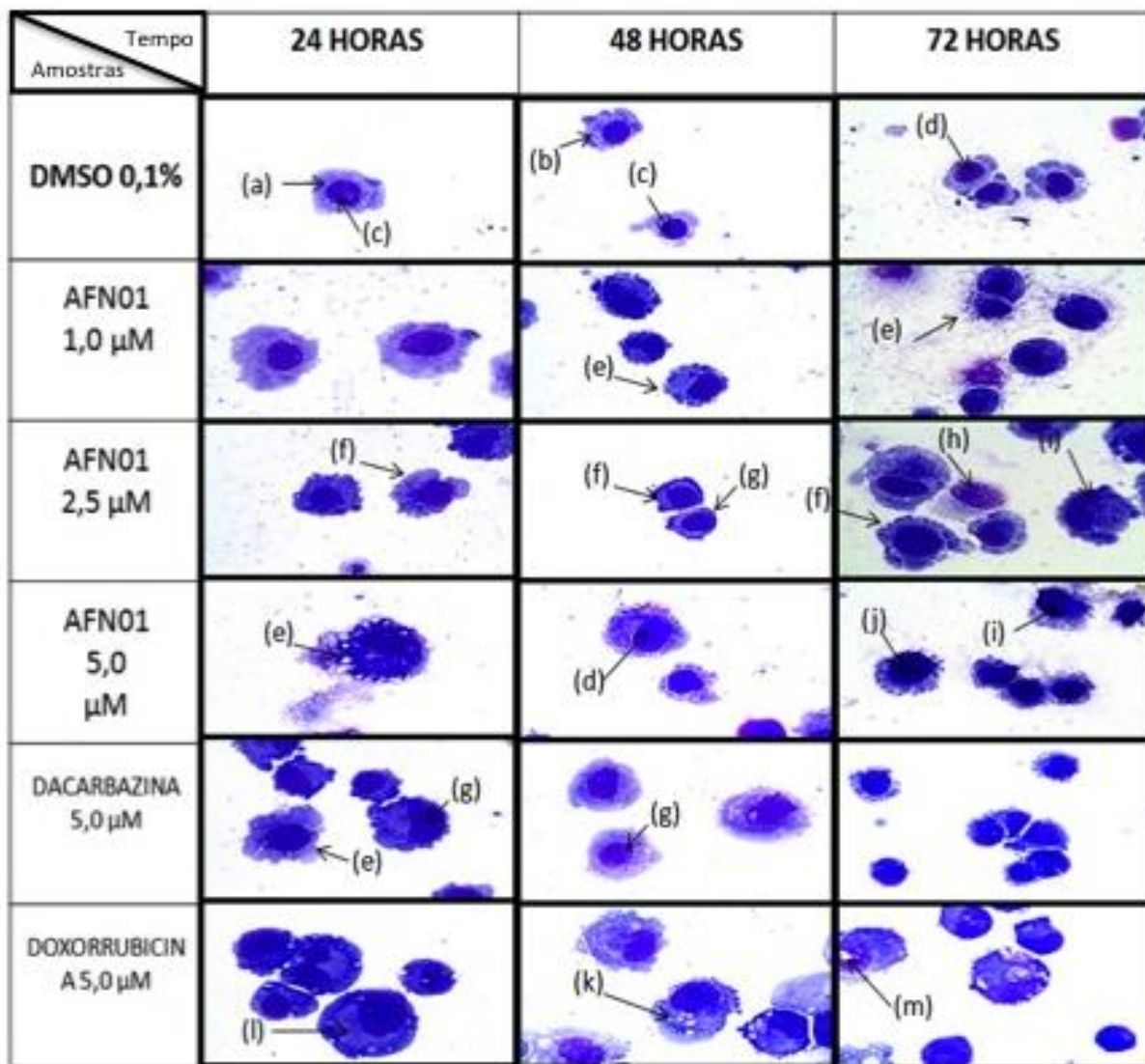


Figura 23 – Ensaio de Avaliação Morfológica Hematoxilina / Eosina – SK- Mel – 28. Citoplasma basofílico (a), vacúolos (b), núcleo basofílico com cromatina densa e pontos de condensação (c), cromatina menos densa (d), lise do citoplasma representado por pequenas vesículas que se desprendem (e), lise acentuada (f), cromatina frouxa (g), cariólise (h), intensa lise celular (e), nucléolos (i), aumento da basofília nuclear (j), lise celular (e), vacúolos citoplasmáticos (k), halos perinucleares (l) cariorrexi (m).

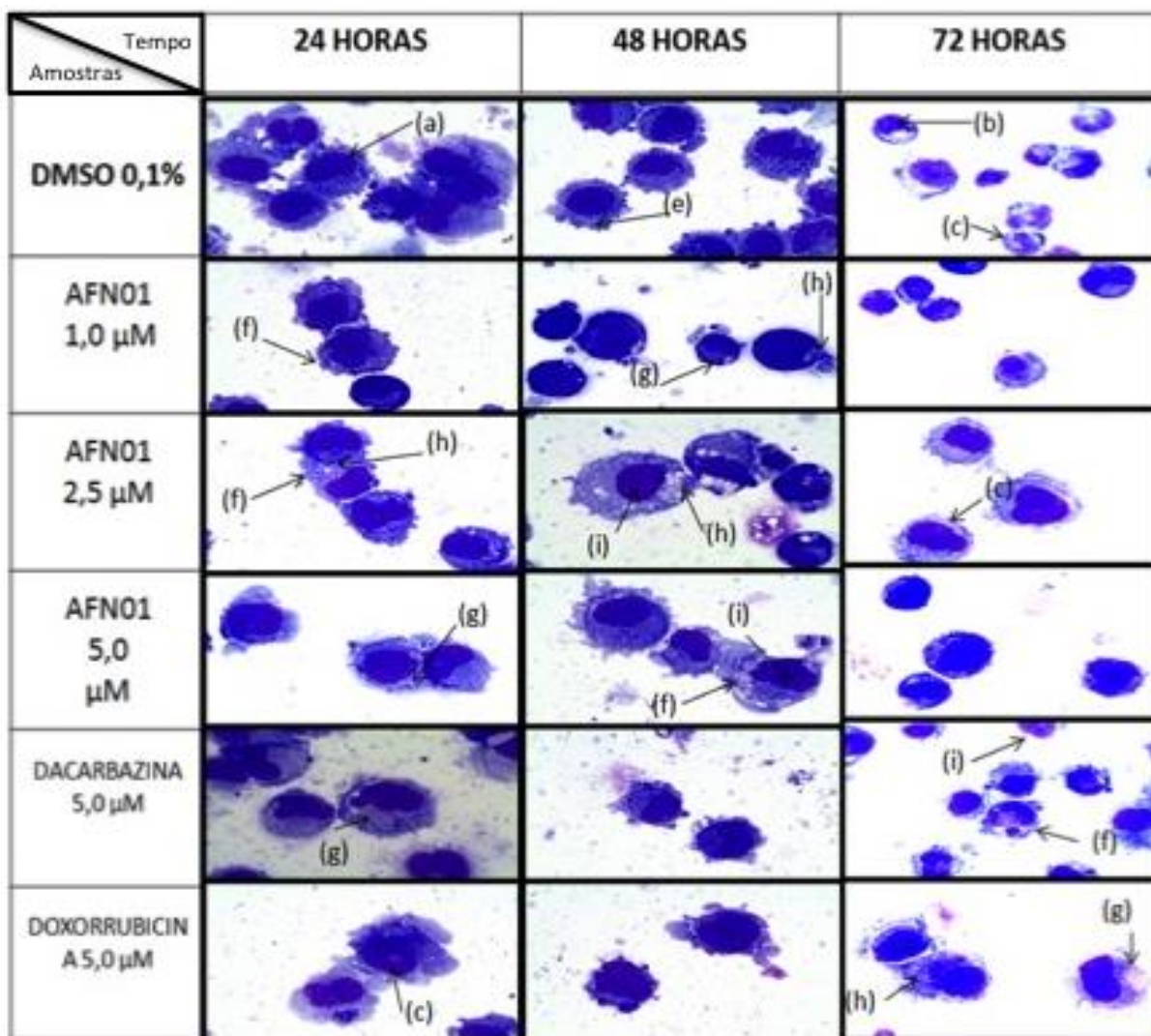


Figura 24 – Ensaio de Avaliação Morfológica Hematoxilina / Eosina – SK- Mel – 103. Núcleos basofílicos (a), condensação de cromatina (b), nucléolos (c), citoplasma basofílico e finamente granular (e), lise do citoplasma representado por pequenas vesículas que se desprendem (f), halos perinucleares (g) e vacúolos citoplasmáticos (h), afrouxamento da cromatina (i).

5.5 Avaliação da genotoxicidade

5.5.1 Teste do Cometa

No ensaio do cometa, teste que avalia a capacidade da substância em gerar danos ao DNA celular, a AFN01, nas concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 μM , causou dano nas linhagens de Sk-Mel 19, Sk-Mel 28 e Sk-Mel 103. Os danos apresentados no teste do cometa incluem quebras simples, duplas e quebra de sítios alcalil lábeis da fita de DNA das células de melanoma estudadas (letras **a**, **c** e **e** das figuras 25 e 26). A capacidade da AFN01 em gerar dano ao DNA foi superior a droga de referência para tratamento do melanoma, dacarbazina, quando comparadas na mesma concentração 5,0 μM e, 95% das células tratadas com AFN01, nas três linhagens analisadas sofreram dano ao DNA (letras **b**, **d** e **f** das figuras 25 e 26).

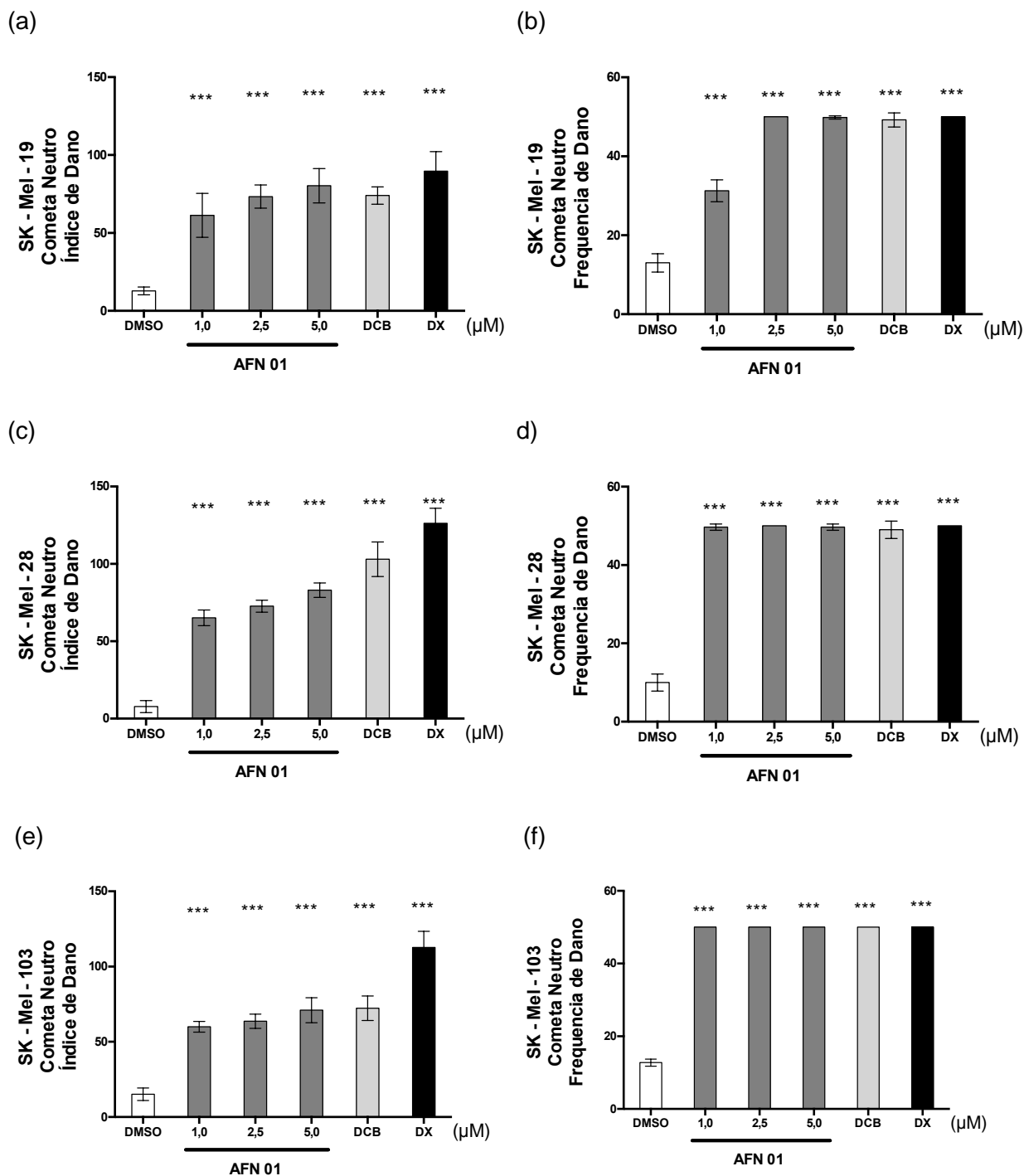


Figura 25 – Teste do Cometa em pH Neutro mostrando os efeitos da AFN01 sobre a fita de DNA. A droga tem efeito concentração dependente nas quebras duplas (a, c, e). Todas as concentrações testadas resultaram em quebras duplas na fita de DNA de mais de 95% das células (b, d, f). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). *** $p < 0,001$ comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

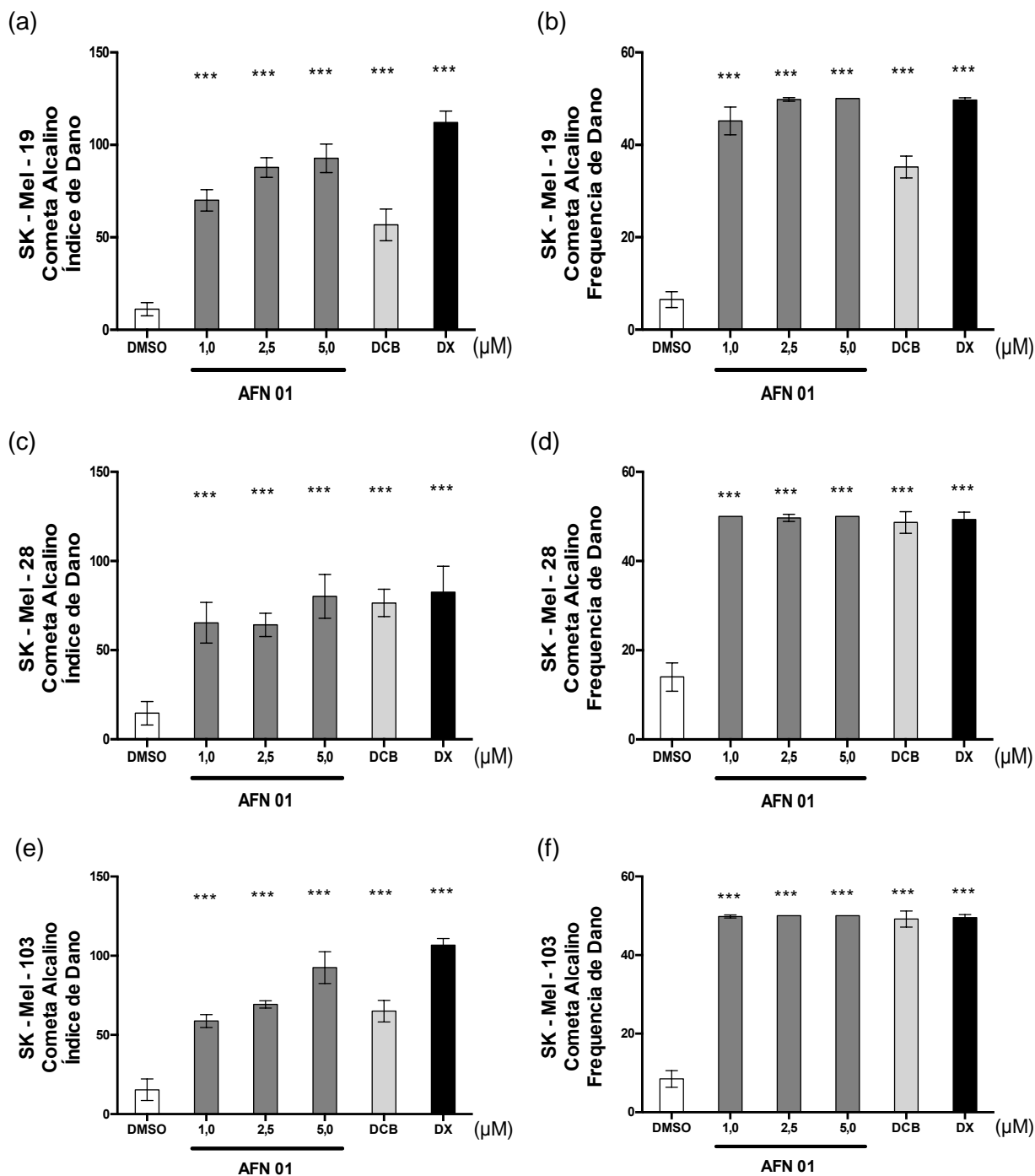


Figura 26 – Teste do Cometa em pH Alcalino mostrando os efeitos da AFN01 sobre a fita de DNA. A droga tem efeito concentração dependente nas quebras simples e duplas da fita de DNA (a, c, e). Todas as concentrações testadas resultaram em quebras simples e duplas na fita de DNA de mais de 95% das células (b, d, f). Cada barra representa a média \pm desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). *** $p < 0,001$ comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

5.6 Avaliação da motilidade e invasão celular

5.6.1 Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular *in vitro*

O ensaio utilizado para avaliar a motilidade das células SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-103 foi o da raspagem celular *in vitro*. Esse ensaio foi realizado durante 72 horas, e as concentrações testadas foram AFN01 (1,0, 2,5 e 5,0 μM), controle negativo DMSO 0,1% e controles positivos dacarbazina 5,0 μM e doxorubicina 5,0 μM .

No ensaio com a célula SK-Mel-19 o efeito de AFN01 inibiu completamente a formação do filme celular sobre a área do risco em todas as concentrações testadas (1,0, 2,5 e 5,0 μM), tendo efeito superior ao controles positivo doxorubicina e a droga de referência no tratamento de melanoma dacarbazina (figura 27). Até o tempo de 48 horas, momento em que ocorre a conclusão do fechamento do filme celular no controle negativo (DMSO). Os controles positivos não apresentaram interferência na capacidade das células migrarem, evidenciando assim o efeito inibitório pronunciado da AFN01 sobre o processo de locomoção celular *in vitro* da SK-Mel-19 (figura 27).

No ensaio de migração realizado com a célula SK-Mel-28 a ação da AFN01 ocorre apenas nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM quando comparado com o controle negativo (figura 28). Esse efeito é percebido no tempo 48 horas, no qual ocorre fechamento do filme celular tanto no controle negativo quanto no controle positivo doxorubicina e dacarbazina. No tempo de 72 horas outro efeito pode ser percebido somente nas maiores concentrações de AFN01 (5,0 μM), as células

começaram a perder aderência o que sugere que a droga pode interferir também com proteínas de adesão celular expressas pela SK-Mel-28 (figura 28).

No ensaio de migração realizado com a célula SK-Mel-103, o resultado apresentado pela ação da AFN01 difere dos efeitos observados nas outras duas células de melanoma. No tempo de 24 horas observou-se que não houve diferença entre as concentrações de AFN01 testadas e os controles positivos, havendo contudo, inibição da migração em relação ao DMSO. No tempo de 48 horas observou-se que ocorreu fechamento do filme celular no controle negativo, enquanto nas concentrações de AFN01 ocorreu uma inibição do fechamento do filme celular devido, provavelmente, a um efeito concentração dependente de perda de aderência celular (figura 29). Houve efeito semelhante das drogas AFN01 e doxorrubicina sobre a SK-Mel-103.

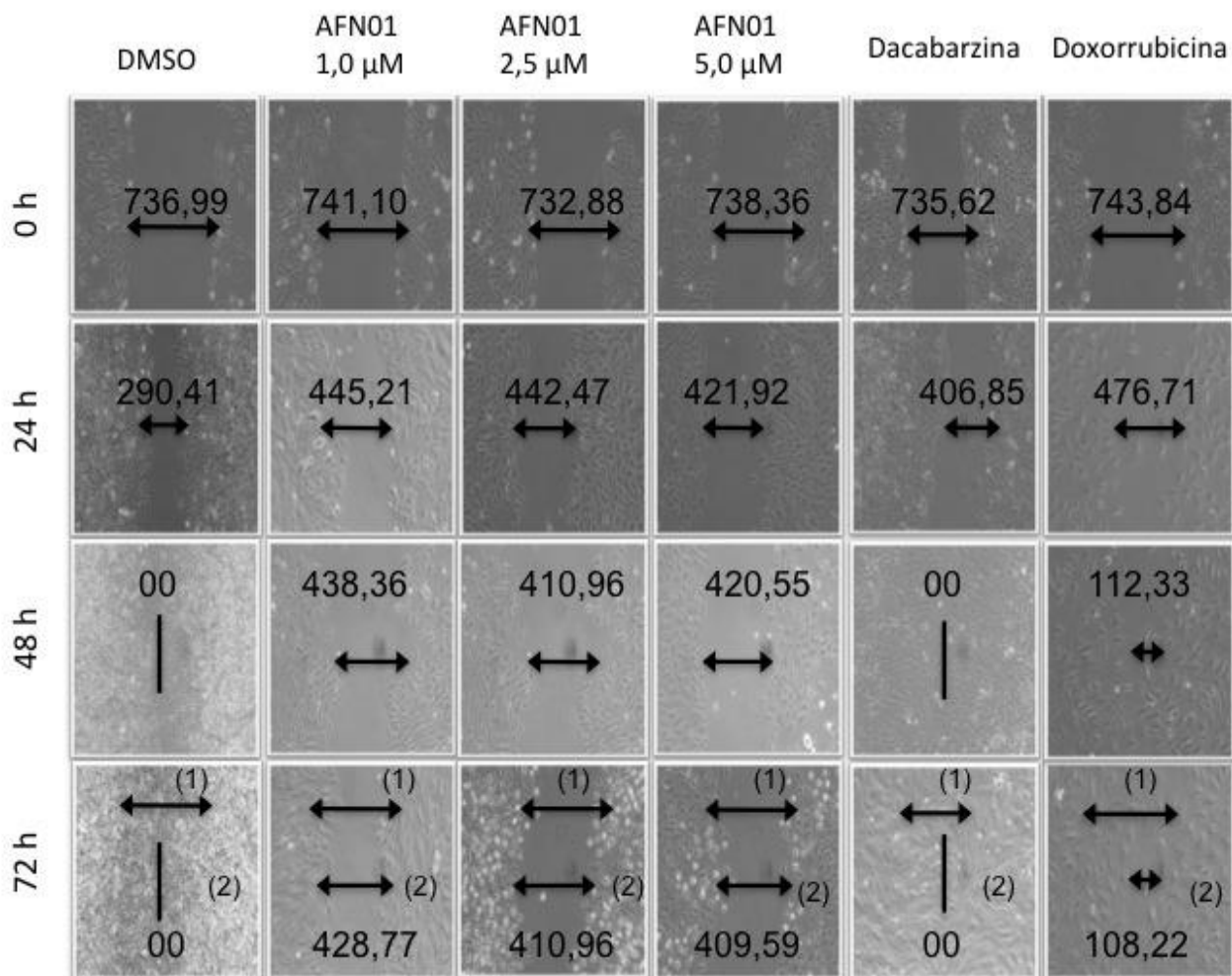


Figura 27 – AFN01 suprime a motilidade e migração em células SK-Mel-19 tratadas por 24 h. As fotos mostram a aparência microscópica dos processos de cicatrização de feridas do controle de células tratadas com AFN01 1,0, 2,5 e 5,0 μ M por 0, 24, 48 e 72 h. SK-Mel-19. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas a 80% de confluência. Depois de gerar um “arranhão” na monocamada, as células foram incubadas com AFN01, DMSO, dacabarzina e doxorubicina. As fotos foram tiradas imediatamente após o ferimento (0 hora) e nos tempos de 24, 48 e 72 h com ampliação de 100 X e escala em μ m. No tempo de 72h (1) indica diâmetro inicial e (2) diâmetro final mensurado. A mensuração do espaço entre os filmes celulares foi feito pelo Software de aquisição de imagens LAS EZ.

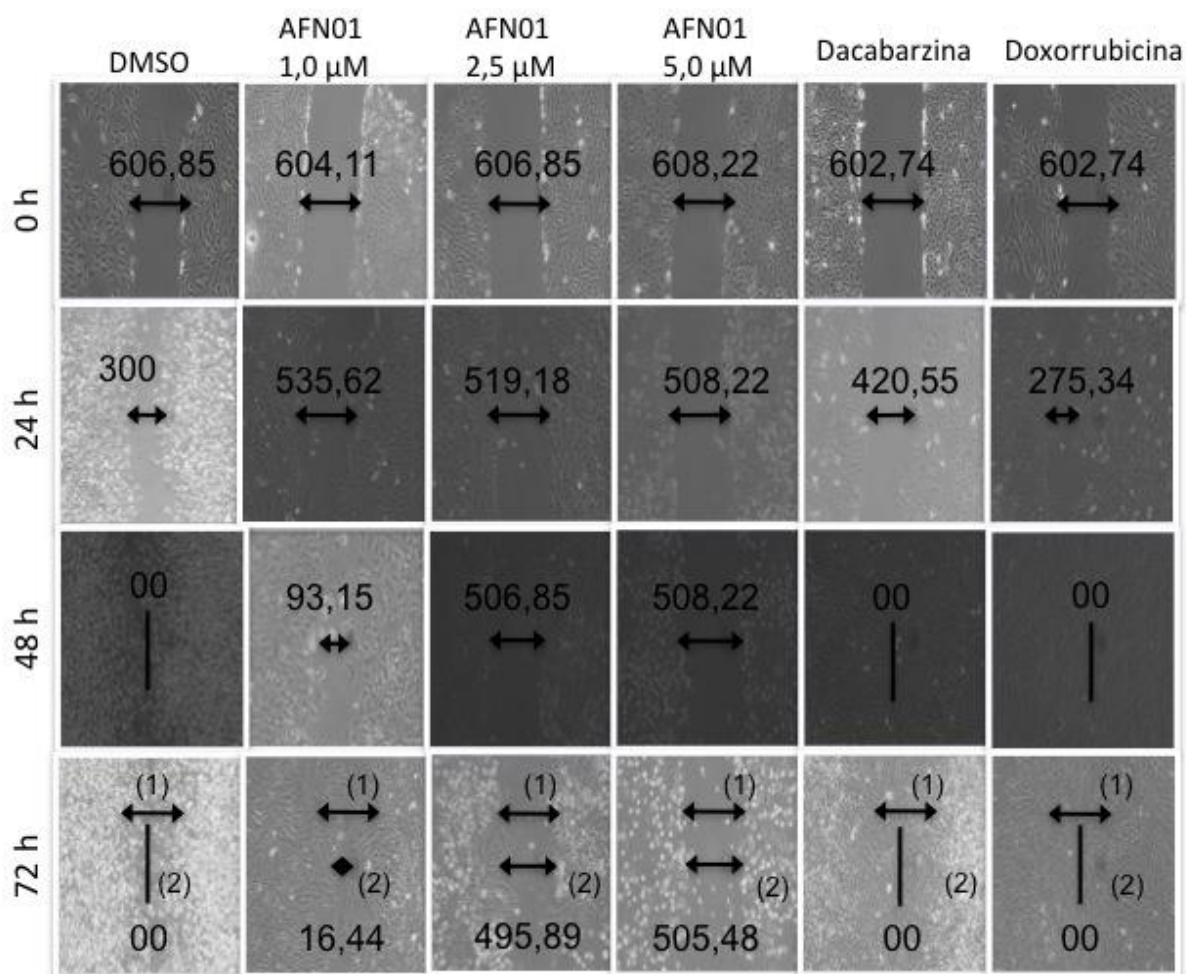


Figura 28 – AFN01 suprime a motilidade e migração em células SK-Mel-28 tratadas por 24 h. As fotos mostram a aparência microscópica dos processos de cicatrização de feridas do controle de células tratadas com AFN01 1,0, 2,5 e 5,0 μM por 0, 24, 48 e 72 h. SK-Mel-28. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas a 80% de confluência. Depois de gerar um “arranhão” na monocamada, as células foram incubadas com AFN01, DMSO, dacabazina e doxorubicina. As fotos foram tiradas imediatamente após o ferimento (0 hora) e nos tempos de 24, 48 e 72 h com ampliação de 100 X e escala em μm . No tempo de 72h (1) indica diâmetro inicial e (2) diâmetro final mensurado. A mensuração do espaço entre os filmes celulares foi feito pelo Software de aquisição de imagens LAS EZ.

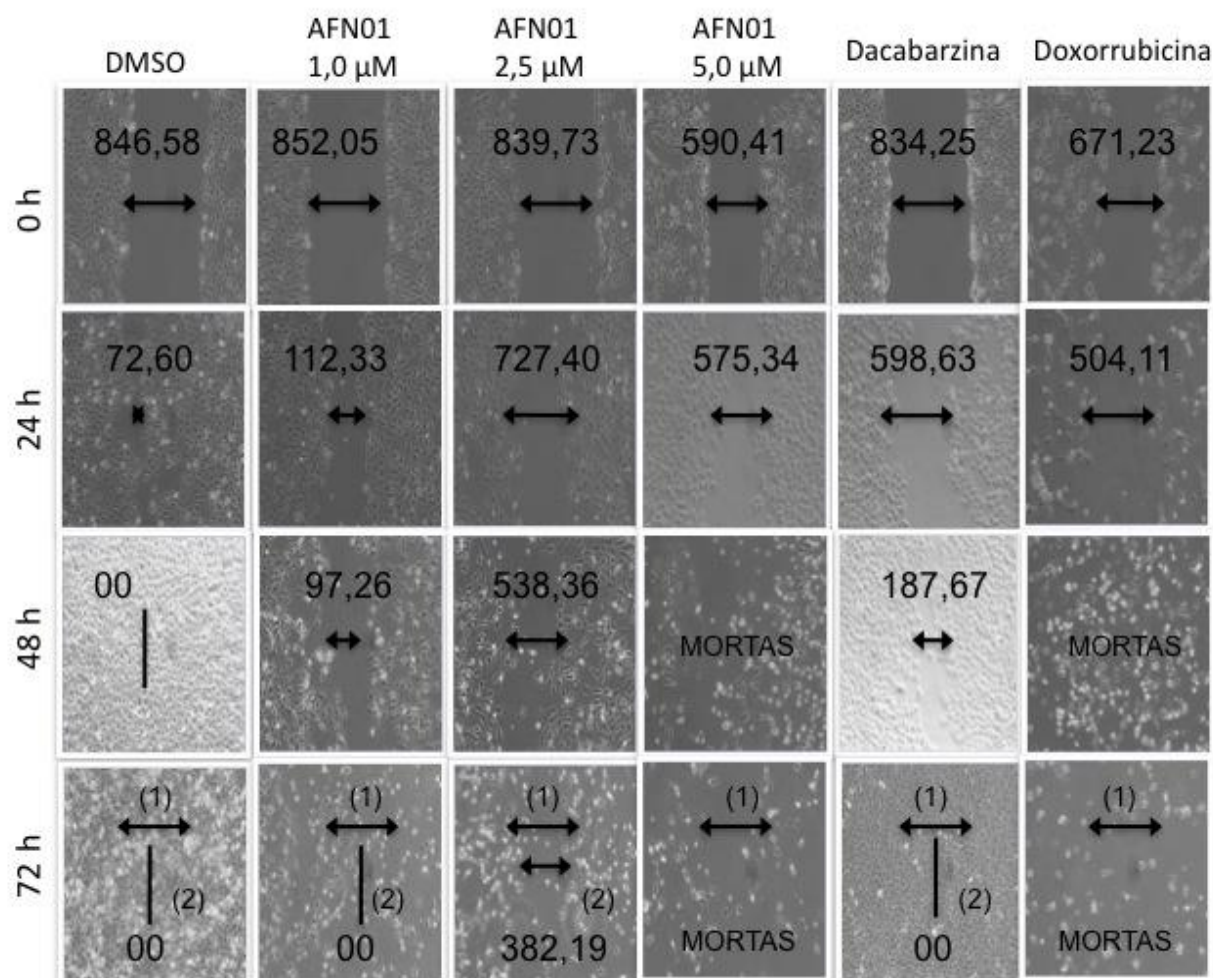


Figura 29 – AFN01 suprime a motilidade e migração em células SK-Mel-103 tratadas por 24 h. As fotos mostram a aparência microscópica dos processos de cicatrização de feridas do controle de células tratadas com AFN01 1,0, 2,5 e 5,0 μM por 0, 24, 48 e 72 h. SK-Mel-103. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas a 80% de confluência. Depois de gerar um “arranhão” na monocamada, as células foram incubadas com AFN01, DMSO, dacabazina e doxorubicina. As fotos foram tiradas imediatamente após o ferimento (0 hora) e nos tempos de 24, 48 e 72 h com ampliação de 100 X e escala em μm . No tempo de 72h (1) indica diâmetro inicial e (2) diâmetro final mensurado. A mensuração do espaço entre os filmes celulares foi feito pelo Software de aquisição de imagens LAS EZ.

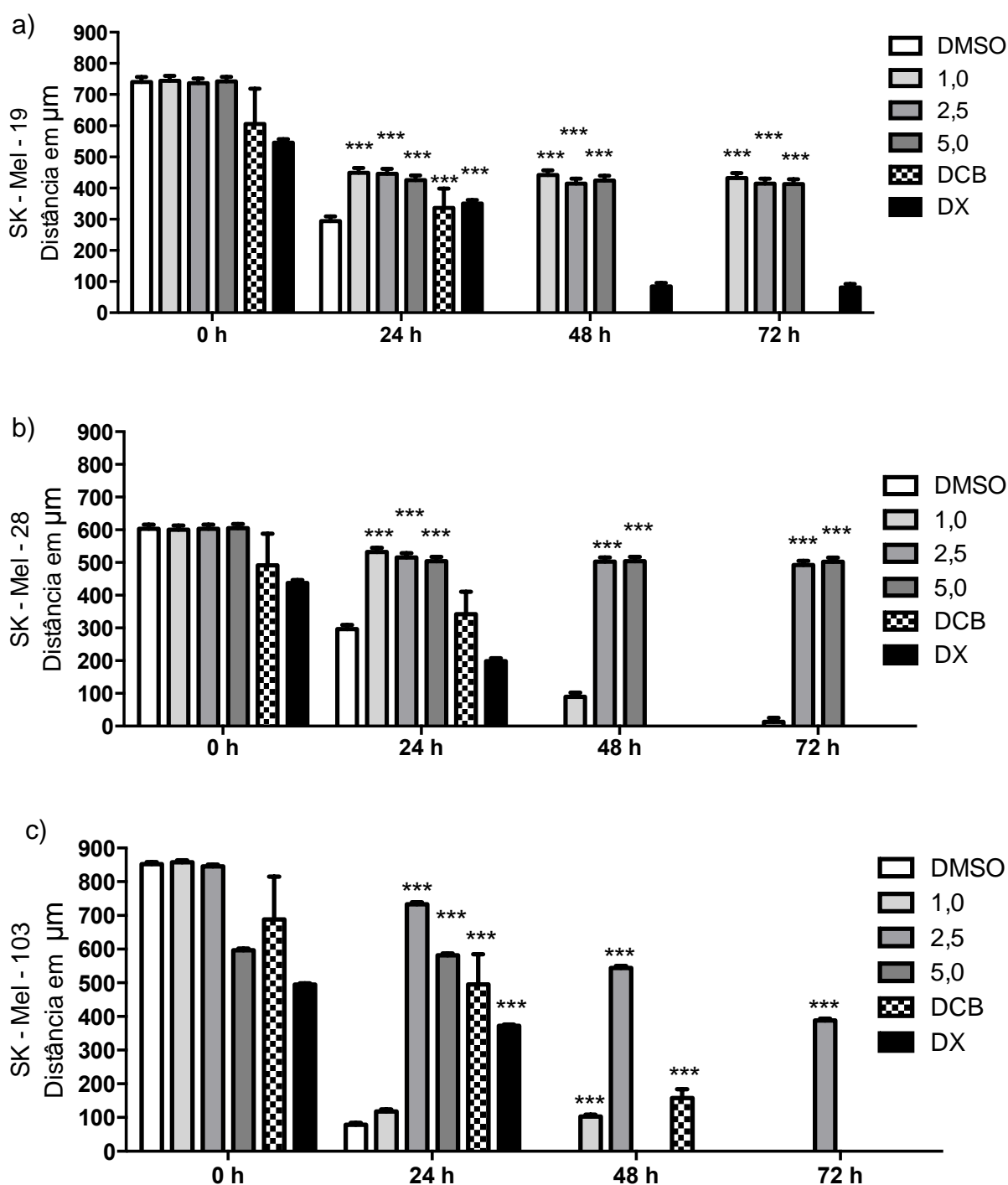


Figura 30 – Avaliação da motilidade pelo ensaio de raspagem celular *in vitro* – A capacidade de atravessar a membrana basal proporciona as células neoplásicas a possibilidade de invadir tecidos adjacentes. O ensaio de raspagem celular *in vitro* avalia o efeito inibitório da droga AFN01 sobre a migração das células SK – Mel 19, SK – Mel 28 e SK – Mel 103 em um plano horizontal sem obstáculos. A inibição da migração é observado nos quadros a, b e c, onde: 1-Controle; 2-AFN01 1,0 µM; 3-AFN01 2,5 µM e 4-AFN01 5,0 µM. Cada barra representa a média ± desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). **p<0,01, *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

5.6.2 Migração vertical, utilizando câmara de Boyden

No ensaio de migração em câmara de Boyden a droga AFN01 demonstrou diminuição acentuada, significativa a nível de $p < 0,001$, concentração dependente, da migração celular das três linhagens de Sk-Mel estudadas (letra **a**, **c** e **e** da figura 31). A linhagem Sk-Mel-103 apresentou maior resistência aos efeitos da AFN01 sobre sua capacidade migratória, demonstrando uma média de 200 células migradas na concentração de $5,0 \mu\text{M}$. A linhagem Sk-Mel-19 apresentou menor número de células migradas sob ação da AFN01 que a linhagem Sk-Mel-28.

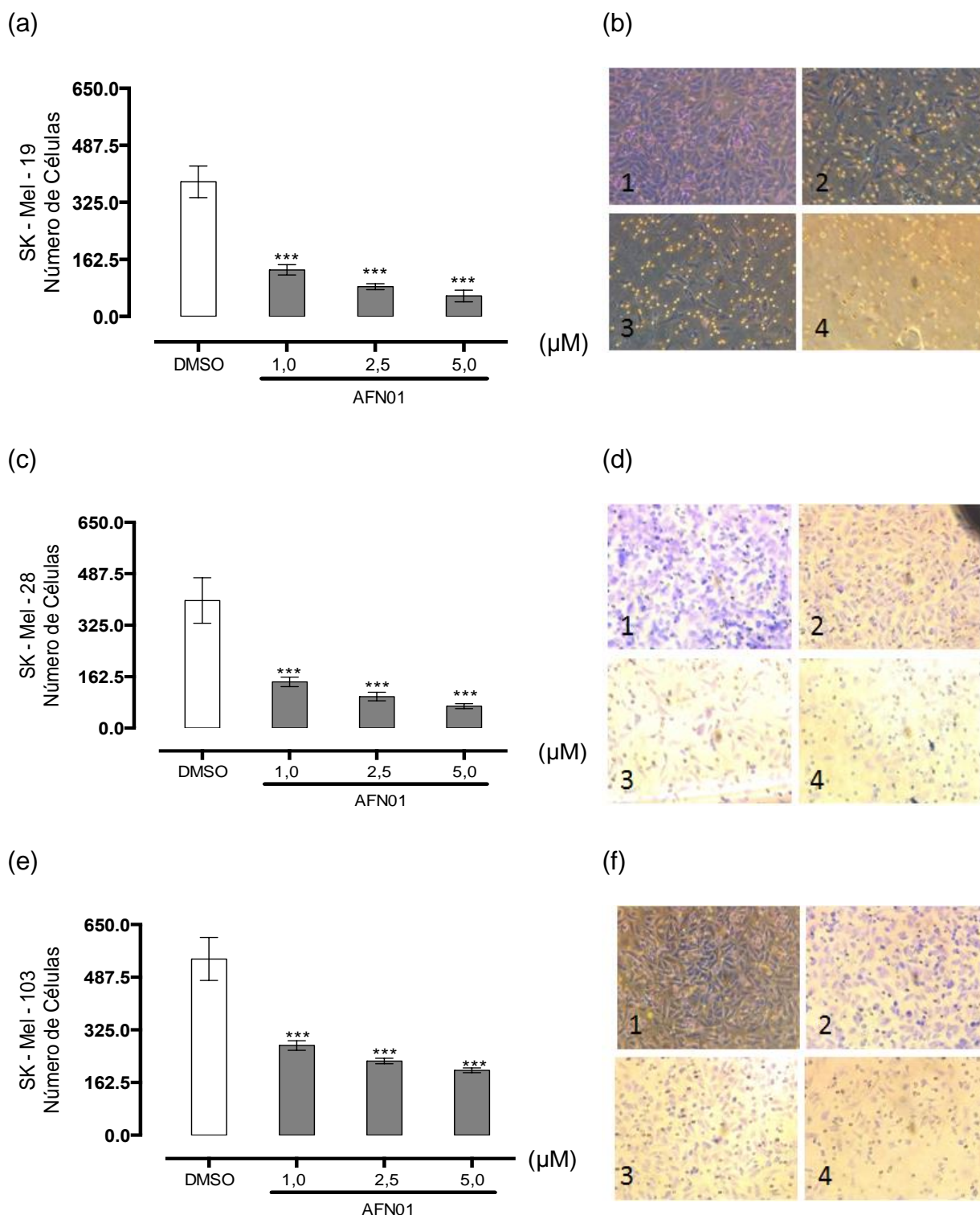


Figura 31 – Migração Vertical em Câmara de Boyden – A motilidade é característica intrínseca de tumores malignos. No ensaio de migração vertical *in vitro*, que simula essa capacidade, a droga AFN01 inibiu a migração das células SK – Mel 19, SK – Mel 28 e SK – Mel 103, nos quadros **b**, **d** e **f** onde: 1-Controle; 2-AFN01 1,0 μM; 3-AFN01 2,5 μM e 4-AFN01 5,0 μM. A ação concentração dependente é observado nos gráficos **a** e **c**. Cada barra representa a média ± desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). **p<0,01, *** p<0,001 comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

5.6.3 Invasão em matrigel, utilizando câmara de Boyden

No ensaio de invasão em câmara de Boyden a droga AFN01 demonstrou inibição acentuada, concentração dependente, da invasão celular da linhagem Sk-Mel-28 estudada (letra **c** e **d** da figura 32). Nas demais linhagens também houve o efeito inibitório, concentração dependente, produzida pela ação de AFN01 em todas as concentrações. O quantitativo de células que invadiram o matrigel na amostra controle das linhagens SK-Mel-19 e SK-Mel-103 foi muito inferior ao quantitativo de células que invadiram o matrigel na amostra controle da linhagem SK-Mel-28.

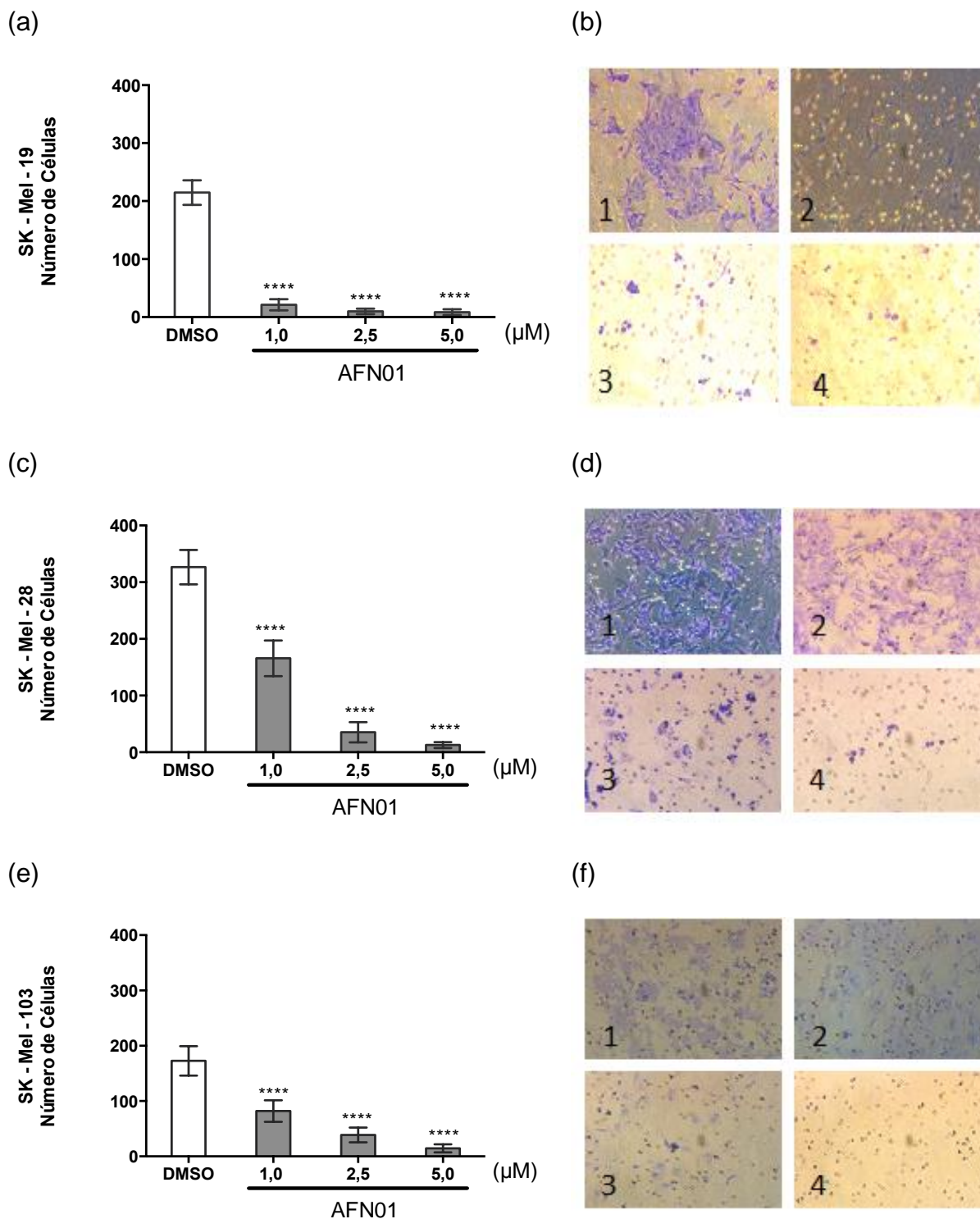


Figura 32 – Ensaio de Invasão em Câmara de Boyden – A capacidade de atravessar a membrana basal proporciona as células neoplásicas a possibilidade de invadir tecidos adjacentes. No ensaio de invasão *in vitro*, que simula essa capacidade, a droga AFN01 inibiu a invasão das células SK – Mel 19, SK – Mel 28 e SK – Mel 103, nos quadros **b**, **d** e **f** onde: 1-Control; 2-AFN01 1,0 µM; 3-AFN01 2,5 µM e 4-AFN01 5,0 µM. A ação concentração dependente é observado nos gráficos **a**, **c** e **e**. Cada barra representa a média ± desvio padrão de três experimentos isolados realizados em duplicata (n=6). *** p<0,001 e ****p<0,0001, comparado ao controle pelo teste de ANOVA seguido de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Os Benzotiazóis são compostos de interesse para o estudo do câncer, eles tem apresentado atividades antitumorais significantes, principalmente, os fenil substituídos (BRADSHAW et al., 2002). Para avaliar o potencial da AFN01 contra linhagens de melanoma este trabalho iniciou-se primeiramente com a atividade citotóxica. A AFN01 foi testada em três linhagens de células de melanoma humano metastático (SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-103), através dos ensaios de Alamar blue e exclusão por azul de tripan onde verificou-se uma interessante citotoxicidade frente a essas linhagens quando comparado com o controle positivo doxorrubicina e a droga dacarbazina (Figuras 15, 16, 17 e Tabela 6).

As concentrações de CI50 abaixo de 10,0 μM encontradas pelos ensaios de Alamar Blue e descritas na Tabela 6 corroboram estudos de Nogueira e colaboradores (2010) que visando conhecer a atividade antitumoral de diversos derivados benzotiazólicos, entre eles o (*E*)-2-((2-(benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol, a AFN01, relataram uma boa atividade citotóxica contra linhagens celulares de leucemia (HL-60), melanoma (MDAMB-435) e cólon (HCT-8). Nesses estudos, a substância AFN01 foi a mais ativa nessas linhagens com CI50 variando 0,52 – 4,40 μM .

Segundo a literatura, compostos puros podem ser considerados promissores para justificar novos estudos, quando apresentarem CI50 menor que 1,0 μM (PESSOA et al., 2000). Considerando esse valor a AFN01 mostrou-se bastante citotóxica contra as três (03) linhagens de células de melanoma humano estudadas no presente trabalho, sendo que esta atividade citotóxica estendeu-se às três linhagens de células independentemente de mutações em *Tp53*, *B-Raf* e *N-Ras*

(Tabela 5). A análise dos dados fornecido pelos ensaios de Alamar Blue presentes na Tabela 5 permite as seguintes observações:

1 - A AFN01 foi mais citotóxica para a linhagem Sk-Mel-28 que possui os genes *Tp53* e *B-Raf* mutados, não expressa a proteína p14 e possui o gene *Ras* selvagem;

2 - A AFN01 foi menos citotóxica para a linhagem Sk-Mel-103 que possui os genes *Tp53* e *B-Raf* selvagens, expressa a proteína p14 e possui o gene *Ras* mutado;

3 - A AFN01 apresentou uma citotóxica intermediária para a linhagem Sk-Mel-19, quando comparada as outras duas linhagens. A Sk-Mel-19 possui os genes *Tp53* e *Ras* selvagens, expressa a proteína p14 e possui o gene *B-Raf* mutado.

Quando comparamos a citotoxicidade apresentada pela AFN01 sobre o mosaico de genes expressos nas três células estudadas pode-se inferir que:

a) A AFN01 possui atividade moduladora sobre os genes *Tp53* e *Raf* mutados, visto a maior citotoxicidade sobre a linhagem Sk-Mel-28 em relação a Sk-Mel-103 que não possui esses genes mutados;

b) Sua ação ocorre a partir da Via de sinalização *Raf* alterada, por não ter sido tão efetiva na célula com o gene *Ras* mutado, Sk-Mel-19;

c) A ação moduladora da AFN01 pode ocorrer diretamente sobre a expressão do *Tp53* ou ser mediada pela ação da droga a nível de proteína *p14* que inibe a ubiquitinação do *p53* pela *MDM2* visto a menor citotoxicidade demonstrada na Sk-Mel-19 que expressa normalmente *Tp53* e *p14*;

d) A toxicidade inferior da AFN01 sobre a Sk-Mel-103 frente a doxorrubicina, em relação as Sk-Mel-19 e Sk-Mel-28 demonstra que sua ação não ocorre sobre a

topoisomerase II e, ou promovendo ligação a cadeia de DNA e sua consequente quebra;

O ensaio de exclusão por azul de tripan consiste na verificação de viabilidade celular pela observação da capacidade de efluxo membranar do corante vital azul de tripan. Como ilustram as Figuras 15, 16 e 17, todas as linhagens apresentaram queda nas porcentagens de proliferação celular na maior concentração estudada (5,0 μM) confirmando o observado no ensaio de Alamar blue (Tabela 6). Também foi observado que não houve aumento da quantidade de células mortas em relação ao controle negativo, o que indica que não houve rompimento direto na membrana celular.

A toxicidade seletiva acentuada da AFN01 sobre as células com o gene *Tp53* e *B-Raf* mutado, apresentada no ensaio do Alamar Blue foi confirmada no teste do Tripan. As figuras 15, 16 e 17 demonstram que nos tempos de 24, 48 e 72 horas a quantidade de células vivas nas três concentrações de AFN01 testadas (1,0, 2,5, 5,0 μM) foram menores nas linhagens Sk-Mel-19 e Sk-Mel-28 do que na Sk-Mel-103. Também foi observado que a quantidade de células mortas não apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo, o que indica parada de ciclo celular ou mais excludentemente necrose acentuada, que não permita a contagem das células. A diminuição superior da quantidade de células vivas apresentada pela maior concentração de AFN01 (5,0 μM) em relação à droga doxorubicina indica uma resistência intrínseca das Sk-Mel-19, 28 e 103 a inibidores da topoisomerase II, não sendo este portanto seu mecanismo de ação. Outro mecanismo que parece estar descartado para a AFN01 é o alquilante, mecanismo da dacarbazina. A diminuição significativa da quantidade de células vivas nas amostras tratadas com AFN01 em relação ao controle positivo dacarbazina e o controle negativo DMSO

descartam a possibilidade que essas substância possuam o mesmo mecanismo de ação.

A marcação com azul de tripan evidencia apenas as células em necrose, com transtorno irreversível da permeabilidade celular, mas não identifica a atividade de mecanismos genético-moleculares de morte celular em curso (BAENA et al., 2001). Portanto, a avaliação conjunta do ensaio de coloração por Laranja Acridina/Brometo de Etídeo e do ensaio de coloração por Hematoxilina/Eosina é necessário para confirmar a participação de AFN01 na produção de processos apoptóticos nas linhagens estudadas.

O ensaio de sobrevivência clonogênica ou ensaio de formação de colônia, usado há décadas para avaliar os efeitos da radiação, quimioterapia, desenvolvimento de medicamentos, triagem de drogas, toxicologia e farmacologia tem várias variações da técnica (crescimento em ágar, superfícies sólidas, tais como placas de Petri, ou matrizes semi-sólidas como metil-celulose), mas o seu objetivo é o mesmo: avaliar se uma célula é capaz de se dividir e formar uma colônia, depois de ter sido exposta a um tratamento. Esta técnica é considerada uma ferramenta útil devido as suas vantagens como: baixo custo, reprodutibilidade, simplicidade e rapidez na seleção de novos quimioterápicos, além de apresentar uma boa correlação com ensaios de viabilidade, como MTT para exames escala moderada (SALMOM et al., 1978; KAWADA et al., 2002; FEDIER et al., 2003; DU et al., 2010).

Os efeitos em sete (07) dias do tratamento com AFN01 foram avaliados pelo ensaio clonogênico. Nesse ensaio foi possível observar que a linhagem Sk-Mel-28 se multiplica em uma velocidade dez (10) vezes mais rápida que as Sk-Mel-19 e 103. Essa observação foi feita com base na quantidade de células presentes no controle negativo DMSO 0,1% das três células. A velocidade superior de

multiplicação da Sk-Mel-28 se dá pela mutação no *Tp53* e pela ausência de expressão do *p14*, essas alterações aumentam a quantidade de fatores de crescimento atuando na célula o que facilita a replicação.

A concentração de doxorubicina (inibidor de topoisomerase II) utilizada no ensaio Clonogênico (5,0 μM) foi letal para as três linhagens de Sk-Mel testadas, independente de suas mutações no *Tp53*, *B-Raf* e *Ras*, o que demonstra a inespecificidade de sua ação.

A AFN01 inibiu significativamente a replicação celular e a formação de colônias visualmente observáveis somente na linhagem Sk-Mel-28, que expressa os genes *Tp53* e *B-Raf* mutados. A AFN01 foi mais eficaz que o alquilante dacarbazina na Sk-Mel-28 em relação ao controle negativo DMSO 0,1%, o que indica mecanismos de ação ou alvos diferentes nas vias celulares.

A célula SK-Mel-103 apresentou uma forte diminuição na formação de colônias sob ação de AFN01 somente na maior concentração (5,0 μM). Na SK-Mel-19 não houve diminuição da formação de colônias em relação ao controle negativo.

O efeito superior da AFN01, na concentração de 5,0 μM , sobre a Sk-Mel-103 em relação a Sk-Mel-19 indica que concentrações maiores da droga podem atuar sobre uma etapa anterior da via *Raf*, atingindo a via *Ras*.

A concentração inibitória 50 (CI50) de AFN01 nas três células em estudo, respectivamente, 4,87 μM , 4,72 μM e >10 μM , no tempo de 72 horas determinaram as concentrações que foram utilizadas no ensaio de coloração por Laranja de Acridina e Brometo de Etídeo, nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Este teste demonstrou a que a totalidade das células tratadas morreram pelo mecanismo de apoptose.

A indução de apoptose de células tumorais é um grande benefício e, fator de escolha para novas drogas a serem utilizadas para a quimioterapia antineoplásica, inclusive do melanoma (LOS et al., 2003).

A apoptose é a morte celular programada da célula que envolve o controle genético de eventos bioquímicos e morfológicos das células, incluindo a externalização da fosfatidilserina, liberação de citocromo c da mitocôndria, ativação de caspase, redução de volume nuclear das células, condensação de cromatina e fragmentação de DNA intranucleossomal, arredondamento celular e a ausência da reação inflamatória, (SUZANNE E STELLER, 2013).

Os resultados dos estudos de citotoxicidade sugeriram que o mecanismo pelo qual a AFN01 induz a morte em células de melanoma se dá principalmente por apoptose, visto que a morfologia das células tratadas e investigadas usando corante Laranja de Acridina / Brometo de Etídio (LA/BE) através de microscopia de fluorescência demonstrou um quantitativo elevado de células com morfologia celular em estado de apoptose frente aos 90% de células viáveis presente no controle negativo. Essa observação reforçou a teoria de que AFN01 exerce sua toxicidade promovendo esse tipo de morte celular. Diferenciando-se o efeito da substância testada nas três linhagens observou-se que a ação da AFN01 foi superior na SK-Mel-28 apresentando um alto índice de células em apoptose, seguida da SK-Mel-19 e SK-Mel-103.

A maior quantidade de células em apoptose nas amostras tratadas com AFN01 no ensaio com Sk-Mel-28 em relação a amostra tratada com dacarbazina indica que os efeitos antiapoptóticos causados pela mutação no gene *Tp53* e pela ausência de expressão do *p14* foram suprimidos pela ação da AFN01. Do mesmo modo o menor efeito da AFN01 sobre a Sk-Mel-103 indica uma resistência da célula

a processos apoptóticos induzidos pela ação da droga. Essa resistência se deve ao fato de que os principais genes de controle da apoptose, *Tp53* e *p14*, não estarem mutados na Sk-Mel-103.

A avaliação da citotoxicidade pode ser feita através da análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular (pela utilização de métodos com corantes vitais ou não), da proliferação celular, de atividade biossintética, etc (FRESHNEY, 1989). A coloração de hematoxilina-eosina (HE) foi utilizada para verificar citotoxicidade e alterações morfológicas das células tratadas com AFN01. A análise com microscopia de luz comum das lâminas coradas com HE revelou grande quantidade de corpos apoptóticos nos grupos tratados quando comparados ao controle negativo.

O ensaio de avaliação da morfologia celular por coloração diferencial HE retrata de modo visual, a nível microscópico, as alterações promovidas pela droga testada nas células tratadas. O ensaio realizado demonstrou que as principais alterações encontradas se deram a nível de membrana, citoplasma e núcleo. Dentre as alterações encontradas descreve-se, vacuolização citoplasmática, formação de bordas citoplasmáticas irregulares (serrilhadas), halos perinucleares, afrouxamento da cromatina, pontos de condensação nuclear, formação de nucléolos e formação de “bleebings”, todas sugestivas de apoptose. A ação da AFN01 foi superior na SK-Mel-28, que teve um alto número de formação de “bleebings” e uma diminuição acentuada do volume celular, seguida da SK-Mel-19 e SK-Mel-103. Estes resultados representam visualmente a susceptibilidade da célula com os genes mutados *Tp53* e *B-Raf* a ação da AFN01. Segundo Suzanne e Steller (2013) as células em apoptose apresentam uma série de modificações físicas, tais como alteração da membrana plasmática, “Blebbings”, permeabilização da membrana externa da mitocôndria,

fragmentação do DNA, e desintegração do núcleo. A presença dessas modificações morfológicas indicam, na medida de sua intensidade e frequência, a susceptibilidade das células testadas a ação da AFN01.

No ensaio de avaliação de danos ao DNA (cometa) a AFN01 foi efetiva nas três linhagens de células testadas, gerando dano de alguma intensidade em todas as células tratadas, independente de sua expressão gênica. Em relação a produção de quebras duplas na fita de DNA a AFN01 apresentou ação semelhante ao alquilante dacarbazina e o inibidor de topoisomerase doxorubicina quando testados na mesma concentração.

A AFN01 também demonstrou no ensaio do cometa a capacidade de produzir quebras duplas, simples e quebra de sítios alcalil lábeis na fita de DNA das células de melanoma estudadas. Nas linhagens Sk-Mel-19 e Sk-Mel-103 a AFN01 demonstrou uma produção de quebras simples e alcalil lábeis superior ao alquilante dacarbazina, o que demonstra sensibilidade a um mecanismo próprio de ação da AFN01. Essa sensibilidade se deve provavelmente a ação dos genes *Tp53* e *p14* selvagens que promovem processos apoptóticos na célula submetida a agentes que causam danos irreversíveis ao seu DNA. Na Sk-Mel-28 a função de promoção da apoptose mediante danos irreversíveis ao DNA esta ausente. Essa ausência é causada pelas mutações presentes nos genes *Tp53* e *p14*, o que pode ter contribuído para o reparo celular e conseqüente menor índice de dano apresentado neste ensaio pela Sk-Mel-28. Esse resultado somado a maior sensibilidade da Sk-Mel-28 a ação citotóxica da AFN01 sugere que a via de morte desencadeada por sua ação não esta ligada diretamente ao rompimento da fita de DNA, mas sim processos de transcrição.

A capacidade de migrar por um determinado espaço que as células neoplásicas possuem é um dos mecanismos que proporcionam as essas células possibilidade de produzir a metástase *in vivo*, desse modo drogas que inibam essa migração são de interesse médico. O teste de migração descrito por Liang e colaboradores (2007), é um teste que fornece informações sobre o efeito de uma droga sobre a locomoção das células metastáticas *in vitro*.

O ensaio de migração demonstrou que AFN01 teve ação inibitória sobre a migração e adesão de todas as linhagens de melanoma metastático humano tratadas. O aumento da motilidade celular é outra característica associada à malignidade (Zhang et al., 2013). No ensaio com a célula SK-Mel-19 o efeito de AFN01 inibiu completamente a formação do filme celular sobre a área do risco em todas as concentrações testadas (1,0, 2,5 e 5,0 μM), tendo efeito superior ao controle positivo doxorrubicina e a droga dacarbazina (figura 27).

No ensaio de migração realizado com a célula SK- Mel-28 a ação da AFN01 ocorre apenas nas maiores concentrações, 2,5 e 5,0 μM . Na maior concentração de AFN01 (5,0 μM), as células começam a perder aderência a partir do tempo de 72 horas o que sugere que a droga pode interferir com proteínas de adesão celular expressas pela SK-Mel-28 (figura 28).

No resultado apresentado no ensaio de migração realizado com a célula SK-Mel-103 a ação da AFN01 difere dos efeitos observados nas outras duas células de melanoma testados e corrobora a tendência apresentada nos demais testes a uma menor sensibilidade dessa célula a AFN01. No tempo de 24 horas a AFN01 na concentração de 1,0 μM não inibe a migração e, na concentração de 5,0 μM não difere dos controles positivos dacarbazina e doxorrubicina. No tempo de 48 horas a doxorrubicina 5,0 μM e a AFN01 causaram perda de aderência celular na SK-Mel-

103 (Figura 29). Essa perda de aderência celular sugere haver indício de interferência na expressão de alguma proteína de membrana, visto que as doses que apresentaram tal efeito foram inferiores a CI50.

O ensaio de migração horizontal sem barreiras demonstrou que a AFN01 foi mais efetiva na inibição da migração da célula com *B-Raf* mutado e controle normal da apoptose (*Tp53*), tendo seu efeito diminuído na célula com *B-Raf* mutado e descontrole da apoptose, e exercendo seu menor efeito inibitório sobre a célula com *B-Raf* e *Tp53* selvagens. Esses resultados sugerem que a atividade inibitória da AFN01 sobre a motilidade das células de melanoma estudadas ocorre entre as vias de sinalização de sinais proliferativos mediado pelo *B-Raf* e o controle da apoptose mediada pelo gene *Tp53*, visto que ação de promoção de processos apoptóticos mediadas pelo *Tp53* selvagem foi necessária para garantir a modulação negativa da AFN01 sobre o gene *B-Raf* mutado da linhagem SK-Mel-19.

Outros ensaios utilizados para avaliar a ação inibitória da AFN01 sobre da motilidade de células SK-Mel foram os de migração e invasão na câmara de Boyden. Esses ensaios simulam a migração e a invasão de tecidos adjacentes pelas células de melanoma e sua possível inibição pela AFN01.

Nos ensaios de migração e invasão em câmara de Boyden foi verificado que as três linhagens de SK-Mel estudadas possuem a capacidade de migrar verticalmente e invadir tecidos adjacentes quando estimuladas por quimiotaxia. A AFN01 teve ação inibitória sobre a migração e a invasão de todas as linhagens testadas. O efeito dessa ação inibitória foi maior na linhagem SK-Mel-19, seguida pela SK-Mel-28 e por último menor na SK-Mel-103.

Os resultados dos ensaios em câmara de Boyden corroboram os resultados dos testes da migração horizontal (arranhão) apresentados. O quantitativo superior

de células da linhagem SK-Mel-19 que migraram e invadiram o matrigel em relação ao número de células que migraram e invadiram o matrigel nas linhagens SK-Mel-28 e SK-Mel-103 indicam que ação inibitória da AFN01 sobre o deslocamento celular, depende da existência de mutações no gene *B-Raf*, além disso a ausência de mutações no gene *Tp53* garante que os processos apoptóticos desencadeados pela ação da AFN01 sobre a via *Raf* se concluam e permitam um maior efeito da droga.

7 CONCLUSÃO

O derivado benzotiazólico (*E*)-2-((2-(Benzo[d]tiazol-2-ila)hidrazono)metil)-4-nitrofenol apresentou um elevado potencial citotóxico nas três linhagens estudadas, independente de quais mutações elas expressavam. Na célula Sk-Mel-28 que expressa os genes *Tp53* e *B-Raf* mutados a ação da AFN01 foi superior a droga doxorrubicina. Os dados fornecidos nos ensaios executados sugerem que sua citotoxicidade não provém de danos diretos à membrana celular.

A AFN01 diminuiu a capacidade proliferativa e de formação de colônias somente da célula com os genes *Tp53* e *B-Raf* mutados (Sk-Mel-28).

O tipo de morte celular induzida pela ação da AFN01 sobre as linhagens de SK-Mel estudadas foi a apoptose e as alterações morfológicas demonstradas pelo HE corroboram com este fato. A AFN01 produziu o maior percentual de alterações condizentes com o processo de morte celular por apoptose na linhagem Sk-Mel-28.

Sua capacidade de gerar danos ao DNA, não é seletiva, promovendo quebras simples e duplas da fita de DNA. Os genes *Tp53* e *p14* mutados promovem reparo no DNA diminuindo o índice de dano na Sk-Mel-28.

A AFN01 inibiu a motilidade horizontal sem barreiras, a motilidade vertical sem barreiras e, inibiu a capacidade de invadir tecidos adjacentes *in vitro*, das células Sk-Mel. A ação da AFN01 sobre o gene mutante *B-Raf* da Sk-Mel-19 foi otimizada pelos processos apoptóticos desencadeados por seu gene *Tp53* selvagem.

A diferença dos efeitos da AFN01 sobre as linhagens estudadas esta ligada aos diferentes genes mutados que essas células expressam. Em especial, destacam-se os efeitos mais expressivos da AFN01 sobre a SK-Mel-19, que possui

o gene *B-Raf* mutante, provável alvo de ação da AFN01, e o *Tp53* selvagem que permite que os danos irreversíveis ao DNA celular resultem em morte.

REFERÊNCIAS

AHMED, S. A.; GOGAL JR.; R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINAI, L. D. C. B.; MONTANAR, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, n. 28, v. 1, p. 118-129, 2005.

ALMEIDA, K. C. **RT-PCR quantitativo em tempo real para análise do receptor de egf em complexos cumulus-oócito colhidos por laparoscopia em cabras caniné submetidas à estimulação hormonal ovariana.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza –CE.

ARMENGOL, E. Classification of melanomas in situ using knowledge discovery with explained case-based reasoning. *Artificial Intelligence in Medicine*, v. 51, p. 93-105, 2011.

BARBOSA, G. S. **Estudo do potencial anticâncer da biflorina sobre células tumorais gástricas.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Manaus, AM.

BARRETO, J. A; O'MALLEY, W.; KUBEIL, M.; GRAHAM, B.; STEPHAN, H.; SPICCIA, L. Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy. *Advanced Materials*, v. 23, p. 18–40, 2011.

BAUER, J.; GARBE, C. Acquired Melanocytic as Risk Factor for Melanoma Development. A Comprehensive Raf of Epidemiological Data. *Pigment Cell Research*, v. 16, p. 297–306, 2003.

BAZZI, R.; BRADSHAW, T.D.; ROWLANDS, J.C.; STEVENS, M.F.G.; BELL, D.R. 2-(4-amiino-3-methylphenyl)-5-fluorobenzothiazole is a ligand and shows species-specific partial agonism of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 237, p. 102-110, 2009.

Genetics Home Reference. B-RAF. Disponível em:
<<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRAF>>. Acesso em: mar/2012.

BOLLAG, G.; TSAI, J.; ZHANG J.; ZHANG, C.; IBRAHIM, P.; NOLOP, K.; HIRT, P. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature*, v. 11, p. 873-886, 2012.

BOX, N. F.; VUKMER, T. O.; TERZIAN, T. Targeting p53 in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Situação do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2013.

BRADSHAW, T.D.; CHUA, M. S.; BROWNE, H. L.; TRAPANI, V.; SAUSVILLE, E. A.; STEVENS, M.F.G. *In vitro* evaluation of amino acid prodrugs of novel antitumour 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazoles. *British Journal of Cancer*, v. 86, p. 1348-1354, 2002.

BROHEM, C.A.; SAWADA, T.C.H.; MASSARO, R.R.; ALMEIDA, R.L.; RIVELLI, D.P.; ROPKE, C.D.; DA SILVA, V.V.; DE LIMA, T.M.; CURI, R.; BARROS, S.B.M.; MARIA-ENGLER, S.S. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicol in Vitro*, v. 23, p. 111–119, 2009.

BROHEM, C.A.; MASSARO, R.R.; TIAGO, M.; MARINHO, C. E.; JASIULIONIS, M. G.; ALMEIDA, R. L.; RIVELLI, D. P.; ALBUQUERQUE, R. C.; OLIVEIRA, T. F.; LOUREIRO, A. P. M. OKADA, S.; SOENGAS, M. S.; BARROS, S. B. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 25, p. 354-369, 2012.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for. DNA electrophoresis. *BioTechniques*, v. 36, p. 214-216, 2004.

CANTLEY, L. C.; BASELGA, J. The Era of Cancer Discovery. *Editorial – American Association for Cancer Discovery*, 2011.

CARPIO, V. N. **Avaliação de apoptose em linfócitos de sangue periférico de pacientes transplantados renais.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS.

CHIN, L.; GARRAWAY, L.A.; FISHER, D.E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. **Genes & Development**, v.20, p. 2149-2182, 2008.

CURY-BOAVENTURA, M.F.; POMPEIA, C.; CURTI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurk at cells. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 721–732, 2004.

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

DAVID, J. P.; SILVA, E. F.; MOURA, D. L. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriopeblanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, 2001.

DAVIES, H.; BIGNELL, G.R.; COX, C.; STEPHENS, P.; EDKINNS, S.; CLEGE, S.; TEAGUE, J.; WOFFENDIN, H.; GARNETT, M.J.; BOTTOMLEV, W.; DAVIS, N.; DICKS, E.; EWING, R.; FLOYD, Y.; GRAY, K.; HALL, S.; HAWES, R.; HUGHE, J.; KOSMIDOU, V.; MENZIES, A.; MOULD, C.; PARKER, A.; STEVENS, C.; WATT, S.; HOOPER, S.; WILSON, R.; JAVYATILAKE, H.; GUSTERSON, B.A.; COOPER, C.; SHIPLEY, J.; HARGRAVE, D.; PRITCHARD-JONES, K.; MAITLAND, N.; CHENEVIX-TRENCH, G.; RIGGINS, G.J.; BIGNER, D.D.; PALMIERI, G.; COSSU, A.; FLANAGAN, A.; NICHOLSON, A.; HO, J.W.; LEUNG, S.Y.; YUEN, S.T.; WEBER, B.L.; SEIGLER, H.F.; DARROW, T.L.; PATERSON, H.; MARAIS, R.; MARSHALL, C.J.; WOOSTER, R.; STRATTON, M.R.; FUTREAL, P.A. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, n. 417, p. 949-954, 2002.

DENT, P. Non-canonical p53 signaling to promote invasion. **Cancer Biology & therapy**, v. 14, n. 10, p. 879–880, 2013;

DHOMEN, N.; MARAIS, R. BRAF Signaling and Targeted Therapies in Melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, p. 529–545, 2009.

DUBEY, R.; SHRIVASTAVA, P.K.; BASNIWAL, P.K.; BHATTACHARYA, S.; MOORTHY, N.S.H.N. 2-(4-Aminophenyl) Benzothiazole: a potent and selective pharmacophore with novel mechanistic action towards various tumor cell lines. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 633-637, 2006.

EGGERMONT, A. M. M; ROBERT, C. New drugs in melanoma: It's a whole new world. **European Journal of Cancer**, v. 47, p. 2150–2157, 2011.

FAGUNDO, E.; RODRIGUEZ-GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, C.; GONZÁLEZ, S.; SÁNCHEZ, R.; JIMÉNEZ, A. Analysis of Phenotypic Characteristics and Exposure to UV Radiation in a Group of Patients With Cutaneous Melanoma. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v.102, p. 599-604, 2011.

FAVERO, G. M.; MARANHÃO, R.C.; MARIA, D. A.; LEVY, D.; BYDLOWSKI, S. P. Synthetic nanoemulsion resembling a protein-free model of 7-ketocholesterol containing low density lipoprotein: *In vitro* and in vivo studies. **Biological Research**, v.43, n.4, p. 439-444, 2010.

FERNANDEZ, A. A.; PANIKER, L.; GARCIA, R.; MITCHELL, D. L. Recent advances in sunlight-induced carcinogenesis using the Xiphophorus melanoma model. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 155, p. 64-70, 2012.

FERRERES, J.R.; MORENO, A.; MARCOVAL, J. Multiple Primary Melanoma. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 100, p. 414-9, 2009.

FOCKE, F.; SCHUERMAN, D; KUSTER, N.; SCHÄR, P. DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure. **Mutation Research**, v. 683, p. 74–83, 2010.

FOLEY, K.; COOLEY, L. Apoptosis in late stage Drosophila nurse cells does not require genes within the H99 deficiency. **Development**, v. 125, p. 1075-1082, 1998.

FRANKE, J. C.; PLÖTZ, M.; PROKOP, A.; GEILEN, C. C.; SCHMALZ, H-G.; EBERLE, J. New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 575-586, 2010.

GANDINI, S.; AUTIER, P.; BONIOL, M. Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 107, p. 362-366, 2011.

HALUSKA, F.; PEMBERTON, T.; IBRAHIM, N.; KALINSKY, K. The RTK/RAS/BRAF/PI3K pathways in melanoma: biology, small molecule inhibitors, and potential applications. **Seminars in Oncology**, v.34, n.6, p. 546-554, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, p. 646-674, 2011.

HOCKER, T.; TSAO, H. Ultraviolet Radiation and Melanoma: A Systemic Raf and Analysis of Reported Sequence Variants. *Human Mutation*, v. 28, p. 578-588, 2007.

HODIS E.; WATSON, I. R.; KRYUKO, G. V.; AROLD, S. T.; IMIELINSKI, M.; THEURILLAT, J. P.; NICKERSON, E.; AUCLAIR, D.; LI, L.; PLACE, C.; DICARA, D.; RAMOS, A. H.; LAURENCE, M. S.; CIBULSKIS, K.; SIVACHENKO A.; VOET, D.; SAKSENA, G.; STRANSKY, N.; ONORIO, R. C.; WINCLER, W.; ARDLIE, K.; WAGLE, N.; WARGO, J.; CHONG, K.; MORTON, D. L.; STEMKE-HALE, K.; CHEN, G.; NOBLE, M.; MEYERSON, M.; LADBURY J. E.; DAVIES, M. A.; GERSHENWALD, J. E.; WAGNER, S. N.; HOON, D. S.; SHADENDORF, D.; LANDER, E. S.; GABRIEL, S. B.; GETZ, G.; GARRAWAY, L. A.; CHIN, L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, v. 150, p. 251-263, 2012.

HOUGHTON, A.; COIT, D.; BICHAKJIAN, C.; DAUD, A.; DILAWARI, R.; DIMAIO, D.; et al. NCCN melanoma practice guidelines. National Comprehensive Cancer Network. *Oncology*, v.12, p.153-177, 2007.

HU, W.; ZHANG, C.; FANG, Y.; LOU, C. Anticancer properties of 10-hydroxycamptothecin in a murine melanoma pulmonary metastasis model *in vitro* and *in vivo*. *Toxicology in Vitro*, v. 25, p. 513-520, 2011.

HUTCHINSON, I.; JENNINGS, S.A.; VISHNUVAJJALA, B.R.; WESTWELL, A.D.; STEVENS, M.F.G. Antitumor benzothiazoles. 16. Synthesis and pharmaceutical properties of antitumor 2-(4-aminophenyl)benzothiazole amino acid prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 744-747, 2002.

INAMDAR, G. S.; MADHUNAPANTULA, S. R. V.; ROBERTSON, G. P. Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochemical Pharmacology*, v. 80, p. 624-637, 2010.

JACOMASSO, T. **Caracterização do perfil de expressão de MMPs e de seus inibidores, TIMPs e RECK, em linhagens representativas dos diferentes estágios de progressão do melanoma humano.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

JANG, S.; ATKINS, M. B. Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant Melanoma. *Lancet Oncol*, v.14, p. 60–69, 2013.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KEMPTON, L. B.; GONZALEZ, M. H.; LEVEN, R. M.; HUGHES, W. F.; BEDDOW, S.; SANTHIRAJ, Y.; ARCHIBALD, S. J.; HASSAN, B. E.; SHOTT, S.; KERNS, J. M. Assessment of axonal growth into collagen nerve guides containing VEGF-transfected stem cells in Matrigel. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, v. 292, p. 214–224, 2009.

KLUMB, C. E.; CAVALCANTI JR, G. B. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, p.111-125, 2002.

KUMARAVEL, T.S.; VILHAR, B.; FAUX, S. P.; JHA, A. N. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 53–64, 2009.

LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. *In vitro* scratch assay: a convenient inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, 2007.

LOCHTER, A.; SREBROW, A.; SYMPSON, C.J.; TERRACIO, N.; WERB, Z.; BISSELL, M.J. Misregulation of stromelysin-1 expression in mouse mammary tumor cells accompanies acquisition of stromelysin-1-dependent invasive properties. **Journal of Biologic Chemistry**, v. 272, n. 8, p. 5007-5015, 1997.

MACHADO, A.; OLIVEIRA, B.; PÁDUA C.; WAINSTEIN, A. Conduta para o melanoma maligno cutâneo. **Revista Médica de Minas Gerais**. V. 14, p.173-179, 2004.

MALDONADO, J. L.; FRIDLAND, J.; PATEL, H.; JAIN, A. N.; BUSAM, K.; KAGESHITA, T.; ONO, T.; ALBERTSON, D. G.; PINKEL, D.; BASTIAN, B. C. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. **Journal of National Cancer Institute**, v.95, p.1878-1880, 2003.

MALPEZZI, E. L.; DE FREITAS, J. C.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. **Toxicon**, v. 31, n. 7, p. 853-864,1993.

MANOHARAN, S.; BALAKRISHNAN, S.; VINOTHKUMAR, V.; SILVAN, S. Anti-clastogenic potential of carnosic acid against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene

(DMBA)-induced clastogenesis. *Pharmacological Reports*, v. 62, p. 1170-1177, 2010.

MÉNORET, M. The genesis of the notion of stages in oncology: the French permanent cancer survey (1943 – 1952). *The society for the social history of medicine*, 2002.

MERCER, K. E.; PRITCHARD, C. A. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1653, p. 25–40, 2003.

MOUAWAD, R.; SEBERT, M.; MICHELS, J.; BLOCH, J.; SPANO, J-P.; KHAYAT, D. Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 74, n. 1, p. 27–39, 2010.

NASCIMENTO, P. R. F. **Melanoma Maligno Congênito: Relato de caso e revisão da Literatura**. 2007. Monografia (Graduação em Medicina) – Universidade Federal de Santa Catarina, Faculdade de Medicina, Florianópolis, SC.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. *Journal of Immunological Methods*, v. 204, p. 205–208, 1997.

NOGUEIRA, A. F.; AZEVEDO, E. C.; FERREIRA, V. F.; ARAÚJO, A. J.; SANTOS, E. A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; VASCONCELOS, T. R. A. Synthesis and Antitumor Evaluation of (*E*)-2-Benzothiazole Hydrazones. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2010.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Experimental Cell Research*, v. 221, p. 19-26, 1995.

PARNELL, C.; WOLL, P. J. Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery (Oxford)*, v. 21, n. 11, p. 272-276, 2003.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion test for cell viability. In: KRUSE-Jr, P. F.; PETERSON-Jr, M. K. Tissue Culture Methods and Applications, *Academic Press*, New York, 1973.

PLUMB, J. A.. Cell Sensitivity Assays: Clonogenic Assay. **Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**, v. 88. P.159-164. 2004.

POON, S. S.; MARTENS, U. M.; WARD, R. K.; LANSDORP, P.M. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. **Cytometry**, n. 36, 1999.

QUEIROLO, P.; ACQUATI, M.; KIRWOOD, J.M.; EGGRMONT, A.M.M.; ROCCA, A.; TESTORI, A. Update: current management issues in malignant melanoma. **Melanoma Research**, v. 15, p. 319-324, 2005.

RANA, A.; SIDDIQUI, N.; KHAN, S.A. Benzothiazoles: A new profile of biological activities. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, p. 10-7, 2007.

RUNDELL, M. S.; WAGNER, E. D.; PLEWA, M. J. The Comet Assay: Genotoxic Damage or Nuclear Fragmentation? **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 42, p. 61–67, 2003.

SÁNCHEZ, P.; PEÑARROJA, R.; GALLEGOS, F.; BRAVO, J.L.; ROJAS, E.; BENÍTEZ-BRIBIESCA, L. DNA damage in peripheral lymphocytes of untreated breast cancer patients. **Archives of Medical Research**, v. 35, p. 480-483, 2004.

SANTOS, M. T. **Prospecção de novos fármacos para melanoma em equivalente dérmico**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-graduação em Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo – SP, 2011.

SHARMA, A.; TRIVEDI, N. R.; ZIMMERMAN, M. A.; TUVESON, D. A.; SMITH, C. D.; ROBERTSON, G. P. Mutant V599EB-Raf Regulates Growth and Vascular Development of Malignant Melanoma Tumors. **Cancer Research**, v. 65 n. 6, 2005.

SHINOZAKI, M.; FUJIMOTO, A.; MORTON, D.L.; HOON, D.S.B. Incidence of BRAF oncogene mutation and Clinical Relevance for Primary cutaneous melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 1753-1757, 2004.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, n. 1, p. 10–29, 2012.

SILVA, A. P. S.; SOUSA, F. S.; OLIVEIRA, M. S.; FERNANDES, A. F. C.; PINHEIRO, A. K. B. Promoção da saúde nas políticas públicas direcionadas ao câncer de mama. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v. 10, n. 2, p. 389-394, 2011.

SILVA, R. R. **O gene *KIAA0090* é ativado em lesão pré-neoplásica e seu silenciamento por siRNA causa morte celular em linhagem de melanoma**. 2010. 90p. II. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SQUIER, M. K. T.; COHEN, J. John. Standard Quantitative Assays for Apoptosis Margaret. **Molecular Biotechnology**, v.19, 2001.

SULLIVAN, R. J.; FLAHERTY, K. T. Resistance to -targeted therapy in melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 49, p. 1297-1304, 2013.

SUZANNE, M.; STELLER, H. Shaping organisms with apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v.20, p.669-675, 2013.

STUCKY, C-C. H.; GRAY, R. J.; DUECK, A. C.; WASIF, N.; LAMAN, S. D.; SEKULI, A.; POCKAJ, B. A. Risk factors associated with local and in-transit recurrence of cutaneous melanoma. **The American Journal of Surgery**, v. 200, p. 770-775, 2010.

SWICK, J. M.; MAIZE, J. C. Molecular biology of melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, In Press, 2012.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; PEREIRA, M. R. P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of biflorin, an o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1416-1421, 2007.

VASCONCELLOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; ARAÚJO, A. J.; PESSOA, C.; LEMOS, T.L.G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; MONTENEGRO, R. C. 2011. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. **Melanoma Research**, v. 21, p. 106–114.

VIDWAN, S. J.; FLAHERTY, K. T.; FISHER, D. E.; TENENBAUM, J. M.; TRAVERS, M. D.; SHRAGERS, J. A. Melanoma Molecular Disease Model. *PloS ONE*, n. 6, p. 182-187, 2011.

TARHINI, A. A.; AGARWALA, S. S. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. *Dermatologic Therapy*, v. 19, n. 1, p. 19-25, 2006.

UICC – Union for International Cancer Control. **Classification of malignant tumors**. 7 ed. Willey-Balckwell, 2009. Disponível em: <http://www.uicc.org/tnm>. Acesso: mar 2012.

WANG, X.; YANG, L.; CHEN, Z.G.; SHIN, D.M. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA Cancer Journal of clinicians*, v. 58, p. 97-110, 2008.

WAJAPPEYEE, N.; SERRA, R. W.; ZHU, X.; MAHALINGAM, M.; GREEN, M. R. Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell*, v. 132, p. 363–374, 2008.

WINNENPENNINCKX, V.; LAZAR, V.; MICHIELS, S.; DESSEN, P.; STAS, M.; ALONSO, S.R.; AVRIL, M.; ROMERO, P.L.O.; ROBERT, T.; BALACESCU, O.; EGGERMONT, A.M.M.; LENOIR, G.; SARASIN, A.; TURSZ, T.; OORD, J.J.; SPATZ, A. Gene Expression Profiling of Primary Cutaneous Melanoma and Clinical Outcome. *Journal of the National Cancer Institute*, v.98, n.7, p. 472-482, 2006.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R. and Currie, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. *International Raf of cytology*, v. 68, p. 251-306, 1980.

APÊNDICE

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividade	Março 2011	Abril 2011	Mai 2011	Junho 2011	Julho 2011	Agosto 2011	Setembro 2011	Outubro 2011	Novembro 2011	Dezembro 2011	Janeiro 2012	Fevereiro 2012	Março 2012	Abril 2012	Mai 2012	Junho 2012	Julho 2012	Agosto 2012	Setembro 2012	Outubro 2012	Novembro 2012	Dezembro 2012	Janeiro 2013	Fevereiro 2013	Março 2013	Abril 2013	Mai 2013	Junho 2013	Julho 2013	Agosto 2013
Revisão da literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Aquisição de materiais para testes									R	R				R	R							R	R	R						
Triagem de substâncias								R	R				R	R																
Ensaio e análise dos resultados															R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Treinamento em cultura de células							R	R	R	R																				
Aula de qualificação													R																	
Testes de avaliação da citotoxicidade																R	R						R	R						
Testes de avaliação da atividade anticlonogênica																									R	R				
Testes de avaliação da motilidade celular																		R							R	R	R			
Testes de avaliação do tipo de morte celular																									R	R	R	R		
Avaliação do Dano Celular																			R	R	R			R	R	R	R	R	R	R
Elaboração da dissertação e artigo científico																									R	R	R	R	R	R
Defesa da dissertação																														R

R- Realizado; X – A realizar;

EQUIPE CIENTÍFICA

Nome	Formação	Função no Projeto
Zanair Soares Vasconcelos	Farmacêutico, Especialista em Farmacologia e Análises Clínicas	Executor
Marne Carvalho de Vasconcellos	Farmacêutica, Mestre e Doutora em Farmacologia (UFC)	Orientadora
Ana Carolina Lima Ralph	Farmacêutica (UFAM)	Colaboradora (UFAM)
Danielle Queiroz Calcagno	Biomédica, Pós-doutoranda em Genética e Biologia Molecular (UFPA)	Colaboradora (UFPA)
Raquel Carvalho Montenegro	Bióloga, Mestre e Doutora em Farmacologia (UFC)	Colaboradora (UFPA)
Gleyce Barbosa dos Santos	Farmacêutica, Mestre em Ciências Farmacêuticas (UFAM)	Colaboradora (UFAM)
Lucas Pio Antony	Graduando em Farmácia	Colaborador (UFAM)
Marília de Arruda Cardoso Smith	Bióloga, Doutorado em Ciências Biológicas (USP), Livre-docência (UNIFESP)	Colaboradora (UNIFESP)
Silvia Stuchi Maria-Engler	Bióloga, Doutora em Biologia Funcional e Molecular (UNICAMP)	Colaboradora (USP)
Thatyana Rocha Alves Vasconcelos	Farmacêutica Industrial, Doutora em Química Orgânica (UFF).	Colaboradora (UFF)

RECURSOS FINANCEIROS

- Os recursos financeiros para a realização desta dissertação foram oriundos de Editais Universais (CNPq).