

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA**

The logo of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a person with arms raised, surrounded by a green laurel wreath. Above the wreath are three pink flowers. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written in a semi-circle at the top, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written in a semi-circle at the bottom. Two small black dots are positioned on the left and right sides of the wreath.

**ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
4'-CLORO-1-NITRO-2-FENILETENO EM MODELO DE MELANOMA**

DOUTORANDA: GLEYCE DOS SANTOS BARBOSA JOBIM

**MANAUS
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
FARMACÊUTICA**

The logo of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a person with arms raised, surrounded by a laurel wreath. Above the wreath are three pink flowers. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written along the top inner edge of the circle, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written along the bottom inner edge. There are two small black dots on the left and right sides of the circle.

**ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
4'-CLORO-1-NITRO-2-FENILETENO EM MODELO DE MELANOMA**

DOUTORANDA: GLEYCE DOS SANTOS BARBOSA JOBIM

ORIENTADORA: DRA. MARNE CARVALHO DE VASCONCELLOS

**MANAUS
2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

J62a Jobim, Gleyce dos Santos Barbosa
Atividade antineoplásica in vitro e in vivo de 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano em modelo de melanoma / Gleyce dos Santos Barbosa Jobim. 2017
144 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Nitroestireno. 2. Apoptose. 3. Melanoma. 4. Antineoplásico. 5. Câncer. I. Vasconcellos, Marne Carvalho de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Cada tic-tac é mais um segundo da vida que passou.

Fugiu e não voltará.

E já que a vida é intensa e com tantos interesses,

o problema é descobrir como vivê-la.

Frida Kahlo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Rute e Ednaldo, que nunca frequentaram uma faculdade, mas que estabeleceram como prioridade absoluta a educação de seus filhos. Que foram sempre fonte de suporte e estímulo na minha caminhada acadêmica, desde as primeiras letras até aqui. Que, mesmo na distância, se fizeram presentes em cada momento, nunca questionaram minhas decisões, me apoiaram sempre e se orgulharam, sem que fosse preciso entender.

Essa conquista também é de vocês.

Aos meus irmãos, Ewelllyn e Ewerton, que foram companhia e desafio, oposição e apoio, semelhanças e diferenças, carinho e respeito... Espero tê-los inspirado de alguma forma, vocês são meu orgulho.

Essa conquista também é de vocês.

Ao meu marido, Caio Jobim, por toda compreensão e paciência, por ter sido meu suporte nos dias fáceis e nos dias mais difíceis, por ter compartilhado todas as minhas angústias e ter sido meu porto seguro de paz e equilíbrio.

Essa conquista também é sua.

À amiga e parceira, Patrícia Daniellé, cuja jornada se confundiu com a minha, pelo incentivo, pela companhia, pelos passeios, por estar comigo em todos os perrengues!

Essa conquista também é sua, nós conseguimos!

Aos estudiosos que nos antecederam e aos que ainda virão, aos que sofrem em decorrência das patologias que estudamos, aos que dedicam suas vidas a amenizar o sofrimento dos outros.

Meu profundo respeito e admiração.

Dedico também a vocês esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

No final de toda jornada é preciso olhar para trás, rever os passos, reconhecer e agradecer a contribuição de todos que, de alguma forma, tornaram a caminhada possível. Ninguém constrói nada sozinho e a gratidão é um dos mais nobres sentimentos humanos, portanto deixo aqui meus sinceros agradecimentos:

À Universidade Federal do Amazonas – UFAM, em especial à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, que tem me acolhido desde 2003, logo que cheguei em terras Amazônicas. Aqui cursei a graduação, habilitação, mestrado e doutorado, que me possibilitaram alcançar meus anseios profissionais e realizar muitos sonhos.

À Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos, que, mesmo sem me conhecer, me convidou a embarcar no desafio do mestrado ao seu lado e, mesmo depois de me conhecer (sabendo das minhas virtudes, defeitos e complicações), aceitou me guiar até o doutorado. São seis anos de estudo sob sua orientação, seis dos anos mais desafiadores da minha caminhada, obrigada por sempre acreditar que eu teria forças para chegar até o fim, obrigada por ter me dado a liberdade que eu precisava e me permitir fazer as coisas do meu jeito, no meu tempo.

Ao Dr. Emerson Silva Lima, que, com sua inabalável crença na pesquisa, tem encarado todos os desafios para criar e fortalecer programas de pós graduação na Região Norte, dando oportunidade a pessoas que, como eu, não querem ter que sair daqui para dar sequência em sua formação. Não tenha dúvidas de que, com essa iniciativa, o senhor está contribuindo para a melhoria da região em muitos aspectos e os resultados serão sentidos em médio e longo prazo pelas próximas gerações.

À equipe do Laboratório Biophar, que estuda, limpa, cultiva, esteriliza, testa, dilui, tabula, interpreta, escreve, ri, escreve mais um pouco, chora, diz que vai desistir, desiste de desistir, chora mais um pouco, ajuda, conversa, tem raiva, se revolta, ri novamente, briga, faz festa, trabalha e segue em frente, a despeito das dificuldades. Tenho grande admiração por todos! Espero ter contribuído um pouco para o crescimento de alguns de vocês.

Ao Dr. Daniel Pereira Bezerra, que aceitou nos receber no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA,

e possibilitou a execução de boa parte desse trabalho cedendo espaço, estrutura, material e conhecimento, sem sua parceria não sei mesmo o que faríamos! À toda equipe do laboratório, destacando Dr. Diogo, Larissa, Carol, Rosane, Ludmila, Thaís, Nana, Cássio, Cinara, Sara e Mayara, obrigada por toda ajuda!

À Dra. Lirlândia Pires de Souza, da Universidade Federal de Minas Gerais, que contribuiu muito orientando e permitindo a realização dos experimentos de western blotting, que foram essenciais para o trabalho.

Aos colegas da UNINORTE, FHEMOAM e Laboratório Sebastião Marinho (SEMSA), por toda compreensão ao longo desses quatro anos. Para cada dificuldade que surgiu, sempre tive a bênção de encontrar alguém disposto a ajudar em todos os lugares por onde passei.

Ninguém disse que seria fácil... E não foi. Mas com a ajuda de todos, foi possível chegar até o fim. E o gosto da conquista compensa o trabalho. Acredito que a grande responsabilidade daqueles que são pioneiros em qualquer coisa é provar que aquilo é possível. Eu e Patrícia fomos as primeiras doutorandas do Programa de Pós-graduação em Inovação Farmacêutica da UFAM e eu acredito que provamos: foi possível! Aos que darão continuidade ao programa, desejo uma excelente caminhada, sejam perseverantes, não desistam, não importa o tamanho do problema, superem, nós somos capazes!

Obrigada!

RESUMO

Diferente da maioria dos outros tumores, a incidência de melanoma cutâneo maligno vem aumentando nos últimos 30 anos. Esse subtipo de neoplasia é responsável por 75% das mortes por câncer de pele. Muitas vias moleculares envolvidas na melanomogênese já foram identificadas. No entanto, ainda não há um protocolo quimioterápico que garanta expectativa de vida a longo prazo. Compostos nitroestirenos são relacionados a atividades antitumorais desde 1975, no entanto, não há relatos dessa eficácia sobre o melanoma. A atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* do derivado nitroestireno sintético 4-cloro-1-nitro-2-feniletano (7E) foi testada em diversas linhagens celulares, com destaque para as de melanoma (SK-MEL-3 e B16F10). A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de Alamar Blue®. Ciclo celular, apoptose, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e despolarização mitocondrial foram avaliadas por citometria de fluxo. A expressão de caspases 9 e 3, JNK, p38, Bcl-2 e ERK foram determinadas por western blotting. E a eficácia e toxicidade *in vivo* foram verificadas em modelo de melanoma murino. Nossas observações experimentais indicam que o composto 7E é citotóxico sobre diversas linhagens neoplásicas, sobretudo as de melanoma, com CI_{50} de 3,13 $\mu\text{g/mL}$ em SK-MEL-3 e 1,48 em B16F10. O composto induz ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs/ERNs), causando aumento da expressão de JNK, p38 e ERK e redução da expressão de Bcl-2. Isso leva à despolarização mitocondrial, provável permeabilização da membrana externa da mitocôndria e liberação de proteínas citotóxicas (DIABLO/Smac, AIF, ENDOG e CYTC), ativação de caspase-9 e caspase-3, resultando em morte celular por apoptose. Os efeitos de 7E são antagonizados pelo pré-tratamento com antioxidante, confirmando a inequívoca importância do acúmulo de EROs/ERNs nesse processo. 7E possui ainda efetiva ação *in vivo* promovendo inibição do crescimento tumoral de até 47,8% do volume nas condições testadas. A investigação do efeito tóxico sistêmico revelou poucas alterações significativas, destacando-se a elevação bioquímica da dosagem sérica de ureia. Não foram observadas alterações relevantes de massa corporal, massa dos órgãos e parâmetros hematológicos. A histologia do tumor revelou necrose e inflamação com áreas de microabcesso, além de invasão de tecido adiposo com reação fagocitária nos animais tratados com 7E. A histologia dos órgãos dos animais tratados com 7E revelou alterações hepáticas moderadas incluindo necrose, degeneração e congestão, alterações renais como congestão focal, hemorragia e esclerose glomerular, redução da ocorrência de metástase pulmonar e manutenção da arquitetura e morfologia cardíaca normal. Sendo assim, 7E tem potencial para ser desenvolvido como agente quimioterápico, sendo necessário mais estudos pré-clínicos e clínicos, que confirmarão sua utilidade na terapia antitumoral, sobretudo sobre o melanoma.

Palavras-chave: nitroestireno, apoptose, melanoma, antineoplásico, câncer;

ABSTRACT

Unlike most other tumors, the incidence of malignant cutaneous melanoma has increased in the last 30 years. This is responsible for 75% of skin cancer deaths. Many molecular pathways involved in melanomogenesis have already been identified. However, there is still no chemotherapy protocol that guarantees long-term life expectancy. Nitrostyrene compounds are related to antitumor activities since 1975, however, there are no reports of this efficacy on melanoma. *In vitro* and *in vivo* antineoplastic effects of the synthetic nitrostyrene derivative 4-chloro-1-nitro-2-phenylethene (7E) were tested in several cell lineages, especially melanoma (SK-Mel-3 and B16F10). Cell viability was assessed by the Alamar Blue® test. Cell cycle, apoptosis, reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial depolarization were evaluated by flow cytometry. Caspases 9 and 3, JNK, p38, Bcl-2 and ERK expressions were determined by western blotting. We performed the murine melanoma model to verify the efficacy and toxicity *in vivo*. Our observations indicate that 7E is cytotoxic to several neoplastic lines, especially melanoma, IC₅₀ of 3.13 µg/mL in SK-Mel-3 and 1.48 µg/mL in B16F10. We found out that 7E increased the level of intracellular reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS). Furthermore, it increased expression of JNK, p38 and ERK, and reduced expression of Bcl-2. This leads to mitochondrial depolarization, possibly permeabilization of the outer membrane of the mitochondria and the release of cytotoxic proteins (DIABLO / Smac, AIF, ENDOG and CYTC), and the activation of caspase-9 and caspase-3, resulting in apoptotic cell death. The effects of 7E are antagonized by antioxidant pretreatment, confirming the unequivocal importance of increased ROS/RNS in this process. 7E also suppressed *in vivo* tumor growth by up to 47.8% under the tested conditions. The systemic toxic effect investigation revealed few significant alterations, highlighting the increase of serum urea biochemical dosage. There were no relevant changes in body mass, organ mass and haematological parameters. Tumor histology revealed necrosis and inflammation with microabscess areas, as well as invasion of adipose tissue with phagocytic reaction in animals treated with 7E. Animals treated with 7E had moderate hepatic alterations including necrosis, degeneration and congestion, renal alterations such as focal congestion, hemorrhage and glomerular sclerosis, reduction of the occurrence of pulmonary metastasis and maintenance of the architecture and normal cardiac morphology. Our findings suggest that 7E may have the potential to be further developed as an anticancer compound, especially for melanoma.

Keywords: nitrostyrene, apoptosis, melanoma, antineoplastic, cancer;

ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection;

ACD: Accidental Cell Death - Morte celular accidental;

AIF: Apoptosis Inducing Factor;

Akt/PBK: Protein Kinase B;

APAF1: Apoptotic protease activating factor 1;

BAK: BCL2 antagonist/killer 1;

BAX: BCL2 associated X, apoptosis regulator;

BH3-only proteins: BCL-2 homology domains 3 (BH3) only protein activation;

BRAF: B-Raf proto-oncogene, serino/treonino quinase;

BRAFV600E: Mutação pontual no códon 600 do gene *BRAF*;

CDK4: Quinase Ciclinodependente 4;

CDKN2A: Inibidor de quinase ciclinodependente 2A;

c-kit: Receptor de tirosinoquinase derivado do oncogene KIT;

CYTC: citocromo C;

dATP: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato;

DCFDA: 2'-7'-doclorohidrofluoresceína diacetato;

DIABLO/Smac: diablo IAO-binding mitochondrial protein;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

DNA: Ácido Desoxirribonucleico;

ENDOG: Endonuclease G;

ERK: extracellular signal-regulated kinase;

ERNs: Espécies reativas de nitrogênio;

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio;

FADD: Fas associated via death domain;

FAS: Fas cell surface death receptor;

FDA: Food and Drug Administration;

IAP: Proteína inibidora de apoptose;

IARC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer;

JNK: c-Jun-N-terminal kinase;

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases, - 41 -; Via das proteínas quinases mitógeno ativadas;

MC1R: Gene do receptor de melanocortina 1;

MEK: Proteína quinase *MEK*;

MITF: Fator de Transcrição Associado a Microftalmia;

MOMP: Mitochondrial outer membrane permeabilization;

NRAS: Oncogene Homólogo ao neuroblastoma viral (v-ras);

p38: p38 mitogen-activate protein kinase;

PTEN: Gene homólogo à fosfatase e tensina;

RB1: Gene Retinoblastoma 1;

RCD: Regulated cell death - Morte celular regulada;

RE: Retículo Endoplasmático;

RUV: Radiação Ultra Violeta;

tBID: BH3-interacting domain death agonist truncated form;

TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor 1;

TP53: Gene da proteína tumoral 53;

TRADD: TNFRSF1A associated via death domain;

TRAILR1: Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1;

TRAILR2: Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand-receptor 2;

UVA: Radiação Ultravioleta A;

UVB: Radiação Ultravioleta B;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura da pele com as divisões entre epiderme, derme e hipoderme e seus anexos (glândulas, pêlos, etc).----- - 24 -
- Figura 2:** Estrutura do epitélio pavimentoso estratificado queratinizado da epiderme, com desque para os melanócitos.----- - 24 -
- Figura 3:** Representação esquemática da evolução do melanoma, desde a iniciação, induzida pela exposição solar, até a metástase. Destacando-se os genes mais envolvidos na melanomogênese espontâneas (*NRAS* e *BRAF*) e hereditária (*CDKN2A*, *CDK4*, *RB1* e *MC1R*).----- - 26 -
- Figura 4:** Vias moleculares envolvidas na fisiopatologia do melanoma. A estimulação de receptores de fatores de crescimento (*KIT*) induz a ativação das vias *MAPK NRAS/BRAF/MEK/ERK* e *NRAS/PI3K/AKT1/MTOR*, ambas envolvidas no processos de proliferação. *MITF* atua sobre *p16* inibindo indiretamente a via do *BRAF* e inibindo a degradação de *p53* por *MDM2*, de maneira a reduzir a transcrição gênica e induzir a morte celular. *PTEN*, por sua vez, inibe *PI3K*, reduzindo também a proliferação. No melanoma mutações em *NRAS*, *BRAF* e *AKT1* induzem a um estado de constante estimulação dessas vias proliferativas. ----- - 29 -
- Figura 5:** Critérios ABCDE no acompanhamento e avaliação de nevos. ----- - 31 -
- Figura 6:** Tipos de melanoma. (A) Melanoma Expansivo Superficial; (B) Melanoma Nodular; (C/D) Melanoma Lentigoso Acral; (E) Melanoma Lentigoso Malígnico; (F/G/H) Melanoma Mucoso.----- - 33 -
- Figura 7:** Evolução temporal da aprovação de medicamentos úteis no tratamento do melanoma pela FDA.----- - 36 -
- Figura 8:** Alvos moleculares da ação dos fármacos trametinib, sorafenib, vemurafenib, dafrafenib, selumetinib e averolimus.----- - 37 -
- Figura 9:** Características morfológicas e eventos moleculares ligados aos mecanismos de morte celular por autofagia, apoptose e necrose.----- - 40 -
- Figura 10:** Processos bioquímicos envolvidos na apoptose pela via extrínseca mediada por receptores de morte e pela via intrínseca dependente de caspase. - 46 -
- Figura 11:** Síntese do 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano (7E).----- - 58 -
- Figura 12:** Descrição esquemática do fluxograma metodológico. ----- - 61 -
- Figura 13:** Alterações morfotintoriais provocadas pelos tratamentos de 24 e 48h com DMSO 10 μ L/mL (A), Doxorubicina 4 μ g/mL (B), Etoposídeo 4 μ g/mL (C), β -

nitroestireno 7E 1 (D), 3 (E) e 10 (F) µg/mL em células da linhagem SK-MEL-3 coradas com panótico rápido (aumento 400x). ----- - 82 -

Figura 14: Gráfico representativo da análise citométrica de marcação com anexina V/PI de células da linhagem SK-MEL-3 tratadas por 24h e 48h com β-nitroestireno 7E nas concentrações de 1,0; 3,0 e 10,0 µg/mL. Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 83 -

Figura 15: Gráfico representativo da análise citométrica de marcação com JC-1 de células da linhagem SK-MEL-3 tratadas por 24h com 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) e por 3h (10,0 µg/mL). Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 88 -

Figura 16: Efeito de 7E na concentração de 10 mg/kg sobre a histologia do tumor, fígado e pulmão de camundongos C57BL/6 tratados um vez ao dia por 13 dias por via intraperitoneal. Doxorrubicina 0,5 mg/kg foi usada no tratamento do grupo controle positivo. DMSO+óleo de Castor (0,1%) em salina foi usado no tratamento do grupo controle negativo. A seta aponta nódulos metastáticos no corte de pulmão do grupo controle negativo e a seta tracejada aponta invasão de tecido adiposo. (400x)-- 107 -

Figura 17: Proposta de modelo de mecanismos de morte celular ativados pelo tratamento da linhagem de melanoma SK-MEL-3 com o derivado nitroestireno 7E. 7E induz ao acúmulo de EROs e ERNs, causando aumento da expressão de JNK, p38 e ERK e redução da expressão de Bcl-2, o que leva à despolarização mitocondrial, provável permeabilização da membrana externa da mitocôndria e liberação de proteínas citotóxicas (DIABLO/Smac, AIF, ENDOG e CYTC), ativação de caspase-9 e caspase-3, resultando em morte celular por apoptose. O pré-tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) inibe a morte celular causada por 7E, confirmando a importância da participação de EROs/ERNs no processo. ----- 119 -

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Comparação entre os valores de CI50 obtidos de 7E e doxorrubicina em linhagens tumorais (MRC5, SK-MEL-3, SK-MEL-28, SK-MEL-103, MES-SA, HCT-116 e B16F10) e normais (MRC5). ----- - 77 -

Gráfico 2: Efeito de 7E nas concentrações de 1, 3 e 10,0 µg/mL sobre a viabilidade da linhagem SK-MEL-3 após 24 e 48h de tratamento pelo método do azul de tripano. Etoposídeo (ETO) 4 foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 79 -

Gráfico 3: Efeito de 7E nas concentrações de 1, 3 e 10,0 µg/mL sobre a morte da linhagem SK-MEL-3 após 24 e 48h de tratamento pelo método do azul de tripano. Etoposídeo (ETO) 4 foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 79 -

Gráfico 4: Efeito de 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) sobre o ciclo celular da linhagem SK-MEL-3 após 24 e 48h de tratamento por citometria de fluxo com marcação com PI. Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 81 -

Gráfico 5: Percentual de viabilidade e morte celular por apoptose e necrose (anexina V/PI) de células da linhagem SK-MEL-3 tratadas com 7E (24 e 48h/ 1,0; 3,0 e 10,0 µg/mL). Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 84 -

Gráfico 6: Efeito de 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) sobre a produção de EROs da linhagem SK-MEL-3 após 3h de tratamento. Análise por citometria de fluxo (DCFDA). Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL e H₂O₂ foram usados como controles positivos. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 85 -

Gráfico 7: Efeito de 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) sobre a produção de superóxido pela linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. - 85 -

Gráfico 8: Efeito de 7E nas concentrações de 1, 3 e 10,0 µg/mL sobre a produção de nitrito pela linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 86 -

Gráfico 9: Efeito de 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) sobre a morte de células linhagem SK-MEL-3 após 24 e 48 h de tratamento com e sem pré-tratamento com NAC. Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 86 -

Gráfico 10: Efeito de 7E (1, 3 e 10 µg/mL) sobre a despolarização mitocondrial da linhagem SK-MEL-3 após 24 e 3h de tratamento. Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 88 -

Gráfico 11: Efeito de 7E (1, 3 e 10 µg/mL) sobre a expressão da enzima caspase 9 clivada na linhagem SK-MEL-3 após 24h de tratamento. Doxorubicina 2 µg/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. - 89 -

Gráfico 12: Efeito de 7E (1, 3 e 10 µg/mL) sobre a expressão da enzima caspase 3 clivada na linhagem SK-MEL-3 após 24h de tratamento. Doxorubicina 2 µg/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. - 90 -

Gráfico 13: Efeito de 7E (1, 3 e 10 µg/mL) sobre a expressão de Bcl-2 na linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Doxorubicina 2 µg/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 91 -

Gráfico 14: Efeito de 7E (1, 3 e 10 µg/mL) sobre a expressão de p-JNK na linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Doxorubicina 2 µg/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 92 -

Gráfico 15: Efeito de 7E (1, 3 e 10 µg/mL) sobre a expressão de p-38 na linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Doxorubicina 2 µg/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 92 -

Gráfico 16: Efeito de 7E nas concentrações de 1, 3 e 10 µg/mL sobre a expressão de p-ERK 1/2 na linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Doxorubicina 2 µg/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.----- - 93 -

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Nomenclatura dos principais tipos de morte celular com base na classificação bioquímica proposta pelo Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (NCCD) em 2012; descrições correspondentes e principais eventos bioquímicos relacionados. - 41 -

Quadro 2: Outras definições de modalidades de morte celular baseadas nas recomendações do Comitê de Nomenclatura de Morte Celular de 2012. - 43 -

Quadro 3: Publicações relevantes a cerca de atividades citotóxicas/ antineoplásicas relacionadas a compostos nitroestirenos. - 54 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características moleculares das linhagens celulares de melanoma, SK-MEL-3, SK-MEL-28 e SK-MEL-103. ----- - 63 -

Tabela 2: Concentração Inibitória 50 do β -nitroestireno 7E sobre as linhagens celulares MRC5, SK-MEL-3, SK-MEL-28, SK-MEL-103, MES-SA, HCT-116 e B16F10. ----- - 78 -

Tabela 3: Frequência de células nas fases sub G1, G0/G1, S e G2/M do ciclo celular após 24 e 48 horas de tratamento com 7E (1, 3 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$). Etoposídeo (ETO) 2 $\mu\text{g/mL}$ foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo. ----- - 80 -

Tabela 4: Efeito de 7E na concentrações de 3 $\mu\text{g/mL}$ sobre a expressão de genes relacionados à carcinogênese em células SK-MEL-3 após 12 horas de tratamento. - - 95 -

Tabela 5: Efeito de 7E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg sobre o peso final da massa tumoral oriundas de camundongos inoculados com células B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação. ----- - 99 -

Tabela 6: Efeito de 7E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos C57BL/6 inoculados com a linhagem B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação. ----- 101 -

Tabela 7: Efeito de 7E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos C57BL/6 inoculados com a linhagem B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação. ----- 102 -

Tabela 8: Efeito de 7E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos C57BL/6 inoculados com a linhagem B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação. ----- 103 -

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	- 19 -
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	- 22 -
2.1	Melanoma	- 22 -
2.2	Mecanismos moleculares no melanoma	- 26 -
2.3	Diagnóstico clínico do melanoma.....	- 30 -
2.4	Classificação clínica e histopatológica do melanoma	- 31 -
2.5	Tratamento.....	- 34 -
2.6	Morte celular na terapia antineoplásica.....	- 38 -
2.6.1	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio e a apoptose ...	- 48 -
2.7	Nitroestirenos	- 50 -
3	OBJETIVOS.....	- 60 -
3.1	Objetivo Geral	- 60 -
3.2	Objetivos Específicos.....	- 60 -
4	METODOLOGIA	- 61 -
4.1	Cultura Celular	- 62 -
4.2	Obtenção do composto	- 62 -
4.3	Linhagens celulares	- 63 -
4.4	Avaliação da citotoxicidade	- 64 -

4.4.1	Ensaio de Alamar Blue®	- 64 -
4.4.2	Ensaio de Azul de Tripano	- 65 -
4.4.3	Análise do Ciclo Celular	- 66 -
4.5	Avaliação do tipo de morte celular	- 66 -
4.5.1	Análise Morfológica	- 66 -
4.5.2	Ensaio de anexina/PI por citometria de fluxo	- 67 -
4.5.3	Identificação de EROs por citometria de fluxo	- 68 -
4.5.4	Produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	- 68 -
4.5.5	Produção de óxido nítrico (NO^{\bullet})	- 69 -
4.5.6	Análise do potencial transmembrânico mitocondrial	- 69 -
4.5.7	Expressão proteica	- 70 -
4.6	Análise da expressão gênica	- 71 -
4.6.1	Isolamento do RNA e transcrição reversa	- 71 -
4.6.2	PCR Array	- 72 -
4.7	Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	- 73 -
4.7.1	Animais	- 73 -
4.7.2	Modelo de melanoma murino <i>in vivo</i>	- 73 -
4.7.3	Toxicidade sistêmica	- 74 -
4.8	Análise estatística	- 75 -
5	RESULTADOS	- 76 -
5.1	7E induz citotoxicidade em células de melanoma Humano	- 76 -

5.2	Envolvimento de EROs e RNSs na citotoxicidade de 7E	- 84 -
5.3	Vias de morte celular afetadas pelo tratamento com 7E	- 87 -
5.4	Influência do tratamento com 7E na expressão gênica de células de melanoma	- 94 -
5.5	7E inibe o crescimento tumoral <i>in vivo</i>	- 98 -
6	DISCUSSÃO.....	- 108 -
7	CONCLUSÃO	- 120 -
8	REFERÊNCIAS	- 121 -
9	APÊNDICE.....	- 134 -
10	Curriculum Vitae Resumido	- 134 -
11	ANEXOS	- 137 -

1 INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo maligno representa apenas 3-5% de todos os casos de câncer de pele, no entanto é responsável por 75% das mortes por esse tipo de câncer (SHENENBERGER, 2012).

Estima-se, para o biênio 2016/2017, a ocorrência de cerca de 596 mil novos casos de câncer no Brasil, dos quais quase 6 mil serão do tipo melanoma cutâneo, cento e sessenta deles ocorrerão na Região Norte do país, sendo trinta e cinco no Amazonas (INCA, 2016).

Embora não seja um dos cânceres mais frequentes, a agressividade, a alta mortalidade e o aumento persistente da incidência do melanoma cutâneo nos últimos 30 anos, sobretudo entre pessoas jovens, justificam os esforços na busca de alternativas de diagnóstico e tratamento (SKIN CANCER FOUNDATION, 2015).

Cerca de 90% dos casos de melanoma são considerados esporádicos, tendo como principais fatores de risco o tipo de pele clara, múltiplos nevos, imunossupressão e, principalmente, a exposição à radiação ultravioleta natural e artificial, principalmente na infância. Casos de melanoma hereditário são raros (10%) e geralmente há o envolvimento de mutações em *CDKN2A*, *CDK4*, *RB1*, *MC1R*, *TP53* ou *PTEN* (LILJANA MERVIC, 2012; SEGURA *et al.*, 2012; LO; FISHER, 2014).

O diagnóstico clínico no melanoma se baseia na observação de manchas na pele, os nevos, e o acompanhamento do surgimento ou alteração de cor, tamanho e forma dos mesmos. Os chamados critérios ABCDE destacam as principais características dos nevos suspeitos de melanoma, a saber assimetria (A), bordas irregulares (B), coloração irregular (C), diâmetro maior que 5 mm (D) e evolução com

alterações de aparência, ulcerações ou sangramento (E) (RIGEL; RUSSAK; FRIEDMAN, 2010).

O aspecto mais importante para o manejo do melanoma é o diagnóstico precoce. Os casos são estadiados em I, II, III e IV. Pacientes diagnosticados em estágio I/II conseguem ser tratados e garantir sobrevida livre de doença em cerca de 70-90% dos casos. Pacientes em estágio III/IV tem expectativa de sobrevida em 5 anos menor que 16% (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; KRAUS; HAENSSLE, 2013).

O tratamento preconizado para o melanoma cutâneo no Brasil é a excisão cirúrgica da lesão e do linfonodo sentinela, quando possível. Casos inoperáveis ou avançados podem ser encaminhados para radioterapia e quimioterapia sistêmica, no entanto, a média de sobrevida nesses casos é de apenas 11 meses (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O primeiro medicamento introduzido na quimioterapia do melanoma cutâneo, em 1975, foi a dacarbazina, uma droga que parece agir como alquilante, antimetabólito e formando pontes dissulfeto. Até 1992 nenhuma novidade foi adicionada ao arsenal terapêutico, quando foi introduzida a interleucina-2 como alternativa. Porém os graves efeitos tóxicos limitam seu uso (REBECCA; SONDAK; SMALLEY, 2012).

A elucidação de vias moleculares envolvidas na melanomogênese e a identificação de mutações específicas em genes relacionados a essas vias, com destaque para *BRAF^{V600E}*, deflagraram o rápido desenvolvimento de terapias guiadas visando principalmente esses alvos. Em apenas 10 anos 8 novas drogas foram aprovadas para o uso no tratamento do melanoma pelo FDA, entre elas o trametinib e o nivolumab (OLSZANSKI, 2014; KIRKWOOD, 2015; PALMIERI *et al.*, 2015).

Além dos aspectos da melanomogênese, a compreensão das vias moleculares envolvidas no processo de morte celular induzida pela quimioterapia é essencial para a predição clínica dos seus efeitos e para a racionalização da terapia. Ao conhecer as vias pelas quais as drogas atuam, pode-se aproveitar ao máximo o seu potencial terapêutico, propor associações benéficas e minimizar os efeitos colaterais (ICHIM, GABRIEL; TAIT, 2016).

Embora o arsenal terapêutico tenha aumentado, pouco se avançou quando se trata de melhora da sobrevida geral dos pacientes acometidos por melanoma. Além disso, medicamentos alvo guiados só são úteis para um seleto grupo de pacientes que apresentam a mutação alvo. Acredita-se que a heterogeneidade dos tumores, a resistência intrínseca e adquirida contribuam para a inefetividade das terapias. Dessa maneira a busca por novas drogas com amplo espectro de ação, eficácia seletiva e baixa toxicidade permanece sendo necessária (PALMIERI *et al.*, 2015).

Compostos nitroestirenos tem suas atividades biológicas descritas na literatura desde 1948, com destaque para as atividades anticâncer. Derivados nitroestirenos obtidos por síntese já demonstraram atividades anti-inflamatória, citotóxica, pró-apoptótica, pró-autofágica e inibidora de enzimas presentes também nas vias de segundos mensageiros MAPK implicadas na melanomogênese. No entanto, não há relato na literatura sobre a avaliação da atividade de betanitroestirenos sobre o melanoma (CLARK, 1948; KIM *et al.*, 2003a; WANG *et al.*, 2007a; CALGAROTTO *et al.*, 2012a; STEWART; ZENG *et al.*, 2015).

Diante do exposto e considerando-se a importância de se explorar os possíveis mecanismos de ação de novas entidades bioativas, propusemos avaliar o potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo* de derivado nitroestireno sintético em modelos de melanoma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Mais de 100 tipos de cânceres já foram descritos, mas a maioria deles ainda carece de diagnóstico e opções de tratamento realmente eficazes. As perspectivas não são boas, pois espera-se um aumento de 70% no diagnóstico de novos casos de câncer nas próximas 2 décadas. De acordo com as estatísticas publicadas pela organização mundial de saúde através da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, 2012), em 2012, 14 milhões de pessoas ao redor do mundo tinham algum tipo de neoplasia. Nessa mesma pesquisa foram registradas 8,2 milhões de mortes acarretadas por câncer, 13% do total de mortes mundiais.

No Brasil, em 2012, foram registradas mais de 188 mil mortes por câncer pela IARC (2012), sendo 1.520 causadas por melanoma.

2.1 Melanoma

“As to the remote and exciting causes of melanosis, we are quite in the dark, nor can more be said of the methodus medendi. We are hence forced to confess the incompetency of our knowledge of the disease under consideration, and to leave to future investigators the merit of revealing the laws which govern its origin and progress....and pointing out the means by which its ravages may be prevented or repressed”

Thomas Fawdington (1795-1843)

*(The Manchester Royal Infirmary, 1826
apud REBECCA; SONDAK; SMALLEY, 2012)*

O ano era 1826, a estrutura do DNA não havia sido descrita, a ciência ainda estava distante de compreender a hereditariedade, as mutações, os polimorfismos e os processos malignos, no entanto, a descrição de casos de câncer, em especial, do melanoma, já despertavam a curiosidade, interesse e o medo (REBECCA; SONDAK; SMALLEY, 2012).

Melanoma é a nomenclatura dada a um grupo de neoplasias originadas de células produtoras de pigmento, os melanócitos. A palavra deriva do grego “*melas*”, escuro, e “*oma*”, tumor. Há rumores de relatos da doença no papiro de Ebers, mas a primeira descrição reconhecida data do século 5º a.c., nas escrituras de Hipócrates. Existem muitas referências a um “tumor negro fatal com metástases e fluido negro pelo corpo” na literatura europeia entre 1650-1760. Evidências arqueológicas revelaram metástases de melanoma em esqueletos de múmias de aproximadamente 2400 anos encontradas no Peru (URTEAGA; PACK, 1966).

Os melanócitos estão predominantemente localizados na pele (figura 1), mais especificamente na epiderme (figura 2), onde representam cerca de 1-2% do tipo celular da camada basal, mas eles também estão presentes nos olhos, ouvidos, trato gastrintestinal, leptomeninges (aracnoide e pia-máter), membrana mucosa oral e genital (SKIN CANCER FOUNDATION, 2015). Eles produzem eumelanina e feumelanina, responsáveis pela pigmentação e fotoproteção. Derivam de progenitores da crista neural e seu crescimento é modulado pelo receptor de tirosinoquinase c-kit e pelo fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) (KIT GENE, 2015; MITF GENE, 2015).

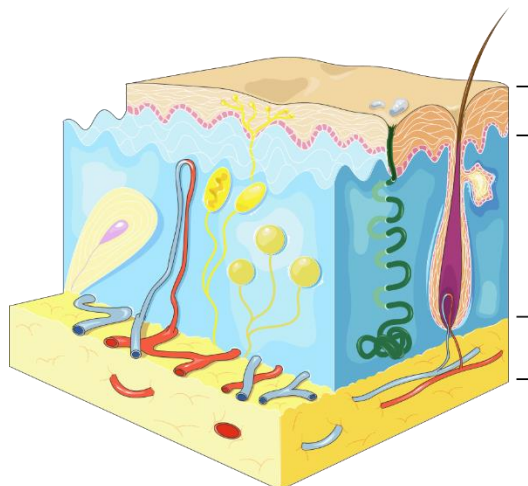


Figura 1: Estrutura da pele com as divisões entre epiderme, derme e hipoderme e seus anexos (glândulas, pêlos, etc).

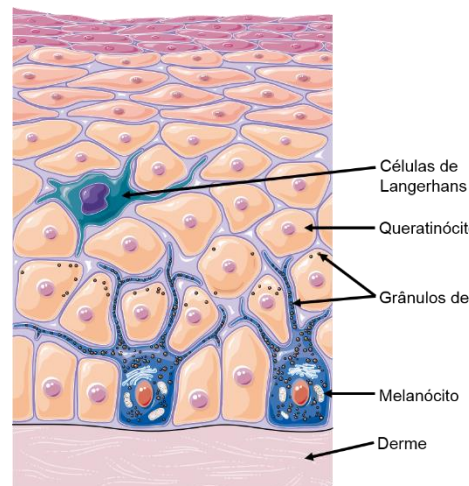


Figura 2: Estrutura do epitélio pavimentoso estratificado queratinizado da epiderme, com destaque para os melanócitos.

Fonte: Adaptados de <http://www.fcencias.com/2015/08/18/banco-de-imagens-cientificas-para-apresentacoes/>. Acesso: 28/10/15.

O desenvolvimento do melanoma é multifatorial, derivando de uma associação entre fatores genéticos e ambientais, os principais fatores de risco são a história familiar, múltiplos nevos, tipo de pele (maior susceptibilidade em pele clara), imunossupressão e principalmente a exposição à radiação ultravioleta (RUV), inclusive proveniente de luz artificial, sobretudo na infância. Os mecanismo exatos pelo qual a RUV deflagra o melanoma não estão completamente elucidados, mas acredita-se que as propriedades carcinogênicas, inflamatórias e imunossupressoras contribuem para a iniciação, progressão e metástase do melanoma primário (JHAPPAN; NOONAN; MERLINO, 2003; LO; FISHER, 2014) (figura 3).

A RUV, sobretudo os comprimentos de onda que ficam na faixa do UVA (400 - 320 nm) e UVB (320 – 290 nm), possuem propriedades benéficas, como a conversão da 7-diidrocolesterol em vitamina D, essencial para o metabolismo do cálcio. No

entanto, o excesso de exposição pode causar danos ao DNA, como a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina ou de pirimidina 6-4 pirimidona, que bloqueiam a replicação do DNA. Se não houver o devido reparo, esses danos devem deflagrar a morte celular. Quando a célula sofre reparo impróprio ou incompleto e resiste aos mecanismos de morte, ocorre acúmulo de dano e início do processo de transformação maligna. As RUV podem ainda causar dano direto sobre RNA e proteínas (TANG, 2010).

Outro importante efeito da exposição à RUV é a indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) capazes de gerar dano ao DNA e peroxidação lipídica. A produção de EROs tem sido largamente relacionada ao processo de melanomagenese, havendo participação dessas moléculas na iniciação, progressão e desenvolvimento de resistência tumoral (LIU-SMITH; DELLINGER; MEYSKENS, 2014).

A indução de estresse oxidativo por estímulo exógeno é uma estratégia muito usada no tratamento do câncer. Alguns agentes quimioterápicos que agem por essa via são a cisplatina, doxorrubicina e azidotimidina. No entanto, essas drogas têm efeito muito limitado no tratamento do melanoma, pois o dano celular causado por elas não é suficiente para permitir uma regressão tumoral expressiva a longo prazo. Motivo pelo qual pesquisas focadas na identificação de moléculas mais eficientes na indução de estresse oxidativo permanecem relevantes (MEIERJOHANN, 2014).

Cerca de 90% dos casos de melanomas são do tipo esporádico, nos quais já foram identificados uma série de mutações, destacando-se aquelas em *BRAF* e *NRAS*. Entre os melanomas considerados hereditários destacam-se o envolvimento de *CDKN2A*, *CDK4*, *RB1*, *MC1R*, *TP53* e *PTEN* (ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008; *BRAF*

GENE, 2015; CDK4 GENE, 2015; CDKN2A GENE, 2015; MC1R GENE, 2015; NRAS GENE, 2015; PTEN GENE, 2015; RBN1 GENE, 2015; TP53 GENE, 2015).

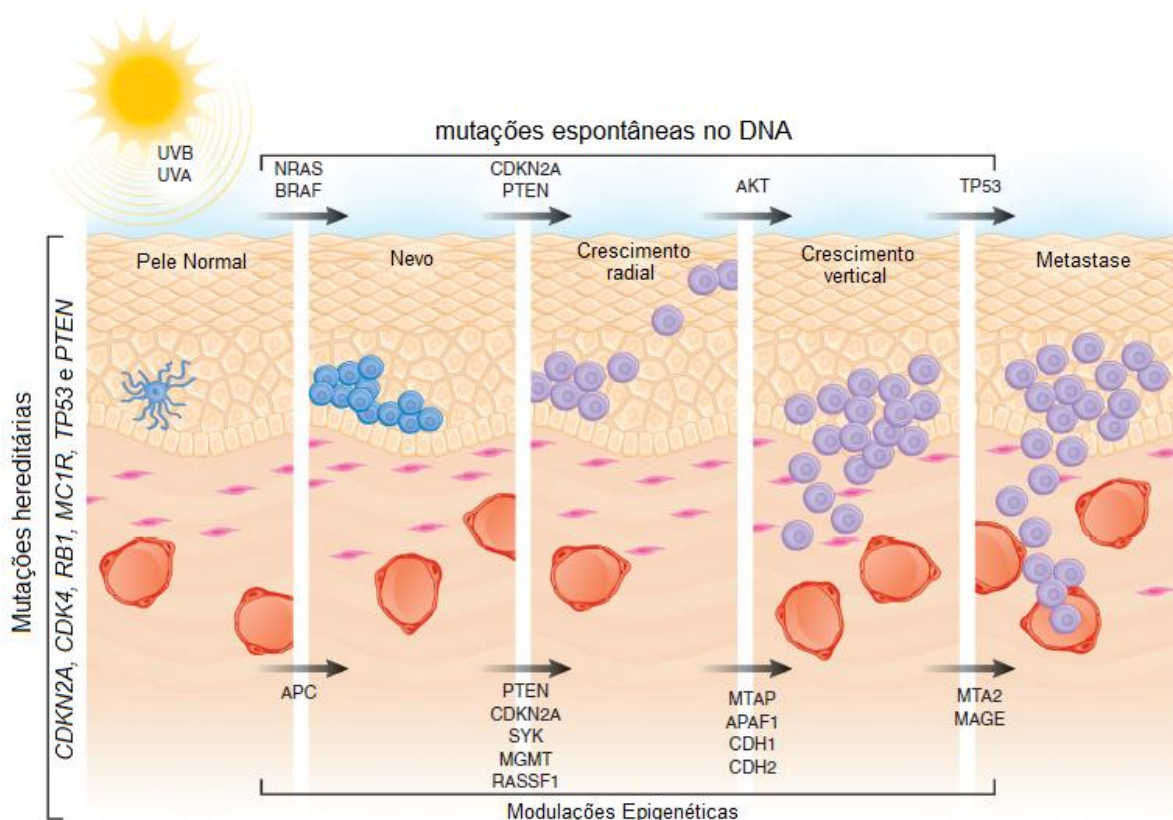


Figura 3: Representação esquemática da evolução do melanoma, desde a iniciação, induzida pela exposição solar, até a metástase. Destacando-se os genes mais envolvidos na melanomogênese espontâneas (*NRAS* e *BRAF*) e hereditária (*CDKN2A*, *CDK4*, *RB1* e *MC1R*).

Fonte: Adaptado de ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008.

2.2 Mecanismos moleculares no melanoma

Em 1911 Peyton Rous realizou experimentos com indução de sarcoma em galinhas que deram início a uma das descobertas mais importantes no campo da oncologia: a compreensão de que o câncer deriva de células normais que adquirem mutações (REBECCA; SONDAK; SMALLEY, 2012). Hoje sabe-se que essas

mutações ocorrem preferencialmente em oncogenes e genes supressores de tumor e levam à manutenção de sinais pró-proliferativos, resistência à morte celular, inativação de supressores de crescimento, ativação dos processos de invasão e metástase, imortalidade replicativa, angiogênese, reprogramação do metabolismo energético, resistência ao sistema imunológico e instabilidade genômica (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A família dos oncogenes *RAS* foi identificada no início dos anos 80 e mutações nesses oncogenes foram relacionadas ao melanoma, principalmente de pacientes jovens, a partir de 1984 (PADUA; BARRASS; CURRIE, 1984). Em 1983 se deu início à investigação da família *RAF*, que mais tarde também seria relacionada à fisiopatologia do melanoma, sobretudo em pacientes maiores de 50 anos (RAPP *et al.*, 1983). *RAS* e *RAF* fazem parte de uma via de transdução de sinais, a via das proteínas quinases mitógeno ativadas (*MAPK*), que mediam a mitose induzida por estimulação extracelular e desempenham um papel central na regulação do crescimento celular, sobrevivência e proliferação (SMALLEY, 2012; PALMIERI *et al.*, 2015; REBECCA; SONDAK).

RAS produz pequenas proteínas ligadas à membrana citoplasmática interna, com 3 isoformas tecido específicas: *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*. Mutações pontuais em *NRAS* estão presentes em cerca de 20% dos melanomas, gerando proteínas quinases constantemente ativadas independente de estímulo, o que resulta na ativação constante das vias *MAPK: BRAF/MEK/ERK* e *PI3K/AKT1/MTOR* (BELLO; ARIYAN; CARVAJAL, 2013; KUNZ, 2013).

O gene supressor de tumor *PTEN*, em condições normais, é responsável pela regulação da via *MAPK* através da inibição de *PI3K*. No entanto ele encontra-se

deletado em cerca de 40% dos casos esporádicos de melanoma, contribuindo ainda mais para a manutenção da expansão da doença (PALMIERI *et al.*, 2015)

Mutações em *BRAF* são encontradas em cerca de 50% dos casos de melanoma, dessas 85% são mutações pontuais do tipo *BRAF*^{V600E}, resultantes da substituição de uma timina por adenina no códon 600, que gera a troca de uma valina por ácido glutâmico na proteína. *BRAF*^{V600E} induz ativação constante de *MEK* quinase, independente de estímulo externo. *MEK* então ativa *ERK*, que induz aumento da transcrição de fatores de crescimento, que induzem a célula a crescer e se multiplicar (DAVIES *et al.*, 2002; A.K.S.; K.T., 2013; OIKONOMOU *et al.*, 2014).

Casos de melanoma hereditário são muito relacionados ao gene *CDKN2A*, que decodifica duas proteínas supressoras de tumor, p16 e p14, cuja função fisiológica é inibir a transcrição gênica e induzir a morte celular através da inibição da via da proteína do retinoblastoma (RB) e da inibição da degradação de p53 por MDM2, respectivamente. Quando mutado o gene *CDKN2A*, reduz-se a expressão de p14, reduzindo-se a estabilidade de p53, o que confere resistência à morte. Além disso ocorre também a redução na expressão de p16 e o aumento da atividade de CDK4, que estimula a transcrição por RB1, induzindo proliferação (SHEPPARD; MCARTHUR, 2013).

A proteína MITF tem envolvimento na pigmentação da pele e participa do controle da proliferação e diferenciação dos melanócitos. Entre outros fatores ela tem seus níveis de atividade influenciado pelas MAPKs e EROs. O controle da atividade de MITF é complexo: a redução ou ausência de expressão predispõe à apoptose, níveis intermediários promovem proliferação e sobrevivência celular e a superexpressão induz diferenciação celular. Tem-se demonstrado a relação entre MITF e o estímulo da atividade de p14 e p16 em situação fisiológica. Mutações

missense (Mi-E318k) no gene supressor de tumor *MITF* confere predisposição genética ao melanoma (TSAO *et al.*, 2012).

Observando-se a rede simplificada de vias moleculares envolvidas no melanoma (figura 4) percebe-se a diversidade de alterações que podem ocorrer individualmente ou coexistir nessa patologia conferindo diferentes graus de gravidade. Sabe-se que alterações simultâneas em BRAF e na via PI3K são muito encontradas, enquanto que alterações em NRAS costumam acontecer isoladamente. A caracterização desses subtipos moleculares tornou-se extremamente importante para o estabelecimento de condutas terapêuticas corretas após a introdução de terapias alvo guiadas na prática clínica (PALMIERI *et al.*, 2015).

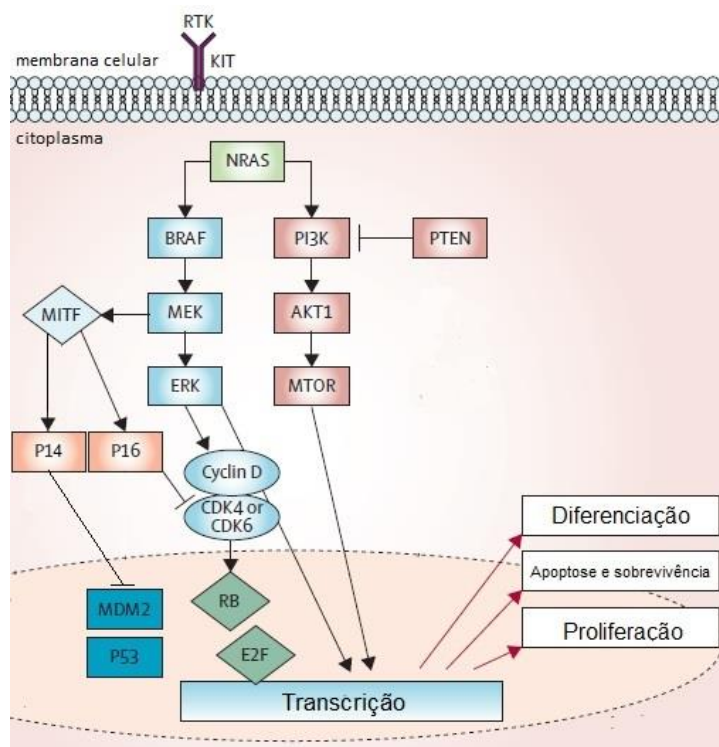


Figura 4: Vias moleculares envolvidas na fisiopatologia do melanoma. A estimulação de receptores de fatores de crescimento (KIT) induz a ativação das vias MAPK *NRAS/BRAF/MEK/ERK* e *NRAS/PI3K/AKT1/MTOR*, ambas envolvidas no processos de proliferação. MITF atua sobre p16 inibindo indiretamente a via do *BRAF* e inibindo a degradação de p53 por MDM2, de maneira a reduzir a transcrição gênica e induzir a morte celular. PTEN, por sua vez, inibe PI3K, reduzindo também a proliferação. No melanoma mutações em *NRAS*, *BRAF* e *AKT1* induzem a um estado de constante estimulação dessas vias proliferativas.

Fonte: Adaptado de EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014.

2.3 Diagnóstico clínico do melanoma

Atualmente campanhas voltadas ao autoexame estão sendo realizadas no sentido de estimular as pessoas a acompanharem as mudanças na própria pele, haja visto que as chaves para o manejo do melanoma são a prevenção e o diagnóstico precoce (RIGEL; RUSSAK; FRIEDMAN, 2010).

O diagnóstico clínico geralmente parte da queixa do paciente a respeito de surgimento de novas lesões pigmentadas ou modificações de cor, tamanho ou forma de um nevo (no Brasil, vulgarmente chamado de “pinta”) preexistente. Assimetria (A), bordas irregulares ou mal definidas (B), coloração mista (C), diâmetro de mais de 0,5 mm (D) e evolução da lesão com surgimento de alterações como o aumento de tamanho ou sangramento (E) são os chamados critérios ABCDE, que podem ser detectados a olho nu já nas fases iniciais do tumor (figura 5) (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A dermatoscopia, introduzida na prática clínica nos anos 90, permite visualizar a distribuição de melanina na epiderme e derme superficial e analisar mais detalhadamente lesões pigmentares aumentando a sensibilidade do exame clínico. Com ela é possível visualizar pigmentação assimétrica, emissão de pseudópodes (estrias irregulares na periferia da lesão), véu cinza azulado (áreas de regressão tumoral) e arquitetura vascular atípica (RIGEL; RUSSAK; FRIEDMAN, 2010; BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

De acordo com as orientações da Portaria 357 do Ministério da Saúde que aprova diretrizes diagnósticas e terapêuticas do melanoma maligno cutâneo (2013), a biópsia excisional da lesão com margens de 1-2 mm de pele normal deve ser realizada

em pacientes com lesões suspeitas de melanoma, sendo o diagnóstico confirmado através do exame histopatológico da lesão.

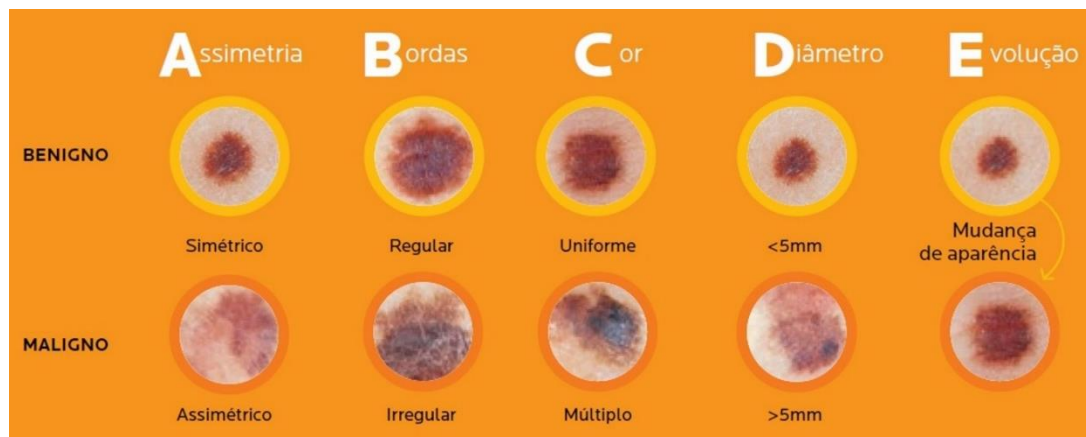


Figura 5: Critérios ABCDE no acompanhamento e avaliação de nevos.

Fonte: Adaptado de <http://www.prnewswire.com/news-releases/sociedade-brasileira-de-dermatologia-e-la-roche-posay-lancam-no-brasil-a-campanha-skinchecker-com-objetivo-de-alertar-a-importancia-da-prevencao-e-diagnostico-precoce-do-cancer-da-pele-522039851.html>. Acesso: 31/10/2015.

2.4 Classificação clínica e histopatológica do melanoma

Atualmente o critério utilizado para a classificação dos melanomas pode se basear na relação entre o grau de exposição solar e o sítio primário do tumor, podendo ser organizados em 4 grupos (BALCH *et al.*, 2009; BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013):

- Melanoma cutâneo com dano solar crônico (CSD) (Fig. 6 E);
- Melanoma cutâneo sem dano solar crônico (non-CSD) (Fig. 6 A/B);
- Melanoma de palmar, plantar e ungueal (Fig. 6 C/D);
- Melanoma mucoso (Fig. 6 F/G/H);

Ou na avaliação das características histológicas do tumor, a saber:

- Melanoma expansivo (ou de espalhamento) superficial (MES) (Fig. 6 A/F/G/H);

- Melanoma Nodular (MN) (Fig. 6 B);

- Melanoma Lentigoso Acral (MLA) (Fig. 6 C/D);

- Melanoma Lentigoso Malígnico (MLM) (Fig 6 E);

A análise anatomopatológica fornece dados sobre o subtipo de melanoma, comprometimento das margens, presença de crescimento radial, presença de crescimento vertical, espessura tumoral (índice de Breslow e nível de Clark), presença de ulceração, invasão vascular ou perineural, regressão, infiltrado inflamatório e índice mitótico. O estadiamento é classificado em 0, I, II, III e IV, de acordo com a profundidade do tumor, o acometimento linfonodal e a ausência ou presença de metástase à distância (SHENENBERGER, 2012; BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).



Figura 6: Tipos de melanoma. (A) Melanoma Expansivo Superficial; (B) Melanoma Nodular; (C/D) Melanoma Lentiginoso Acral; (E) Melanoma Lentiginoso Maligno; (F/G/H) Melanoma Mucoso.

Fonte: Adaptado de <http://www.bpac.org.nz/BPJ/2011/february/melanoma.aspx>, <http://atlasgeneticsoncology.org/Tumors/OralMelanomaID6647.html> e <http://fighteyecancer.com/the-eye/conjunctiva/>. Acesso: 26/10/2015.

2.5 Tratamento

O principal aspecto a ser considerado quando se trata de tratamento do melanoma é o diagnóstico precoce. Conforme as orientações da Portaria 357 (2013), o tratamento de primeira escolha para o melanoma é a cirurgia com ampliação de margens definida em função da espessura tumoral e retirada de amostra de linfonodo sentinela, em casos precoces esse procedimento tem chance de cura em torno de 80%. Não se indica dissecações linfáticas extensas, uma vez que esse procedimento reduz a qualidade de vida e não apresenta ganhos ao paciente. A ressecção de metástase à distância pode ser recomendada em alguns casos que já demonstraram que o procedimento induz aumento da sobrevida, como é o caso da metástase pulmonar, hepática ou cerebral única. A radioterapia está indicada em casos de metástases disseminadas sistêmicas e a terapia sistêmica é a única opção nos demais casos.

O principal quimioterápico utilizado na prática clínica é a dacarbazina, desde 1975, quando foi aprovada para uso pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Desde então tem-se demonstrado que ela prolonga a vida do paciente em cerca de 1 ano apenas. O mecanismo de ação da dacarbazina não é completamente elucidado, mas já se sabe que ela age como antimetabólito (análogo da purina), como agente alquilante e interagindo com grupos SH (SMALLEY, 2012; BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; MEGAHED; KOON, 2014; REBECCA; SONDAK).

A imunoterapia do melanoma iniciou-se em 1992 com a aprovação do uso de interleucina-2 em altas doses. No entanto, poucos pacientes apresentaram resposta efetiva a esse tratamento, que é associado a altos índices de toxicidade. O uso de Interferon α e β foi avaliado, mas não apresentou aumento da sobrevida global dos

pacientes. O próximo agente imunoterápico surgiu em 2011, o antígeno anti-CTLA-4, ipilimumab, que tem sido usado até os dias de hoje em restritos grupos de pacientes cujo subtipo de melanoma é considerado sensível a essa abordagem (CALLAHAN; POSTOW; WOLCHOK, 2013; OTT; HODI; ROBERT, 2013).

Uma das vias de sinalização importantes no melanoma é a *RAS/BRAF*. Dessa forma, a identificação das mutações em *BRAF* abriu caminho para o rápido desenvolvimento de várias terapias alvo guiadas, sendo considerada a “*magic bullet*” do melanoma. Vemurafenib chegou ao mercado em 2011 e até então, não se comprovou um claro benefício de seu uso, haja visto que ele não é capaz de prolongar a sobrevivência dos pacientes além do tempo médio sob uso de dacarbazina. Por esse motivo o governo brasileiro, através do Ministério da Saúde, não recomenda seu uso. No entanto, os hospitais credenciados no SUS e habilitados em Oncologia são responsáveis pela padronização, compra e fornecimento de medicamentos oncológicos, ficando, portanto, a critério de cada unidade estabelecer seu protocolo terapêutico com base nas orientações nacionais e internacionais. Outros medicamentos alvo guiados e imunoterápicos estão aprovados pela FDA e disponíveis para seleção da equipe médica, como trametinib e sorafenib (inibidores dos receptores ativados por estímulos mitógenos), dabrafenib (inibidor de *BRAF^{V600E}*), everolimus (inibidor de *MTOR*), nivolumab e pembrolizumab (anticorpos anti-PD1) e selumetinib (inibidor de *MEK*). Contudo o custo-benefício desse uso ainda seja alvo de controvérsias (figura 7 e 8) (DAVIES *et al.*, 2002; FDA, 2009, 2011; BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; HEPPT *et al.*, 2015; JOHNSON; PENG; SOSMAN, 2015).

Os medicamentos imunoterápicos e alvo-guiados inseridos no arsenal terapêutico do melanoma, de maneira geral são particularmente úteis na redução da

taxa de progressão, ao reduzir ou retardar o crescimento tumoral, e no aumento do tempo livre de doença. No entanto, eles não são capazes de induzir regressão tumoral, sobretudo em monoterapia. Após a introdução de tantos medicamentos na clínica que não apresentaram a eficácia esperada ficou o questionamento sobre o porquê dessa limitação terapêutica. A resposta está justamente na intrincada rede de mecanismos moleculares envolvidos na melanomogênese e na compreensão da heterogeneidade, resistência intrínseca e adquirida desses tumores (PALMIERI *et al.*, 2015).

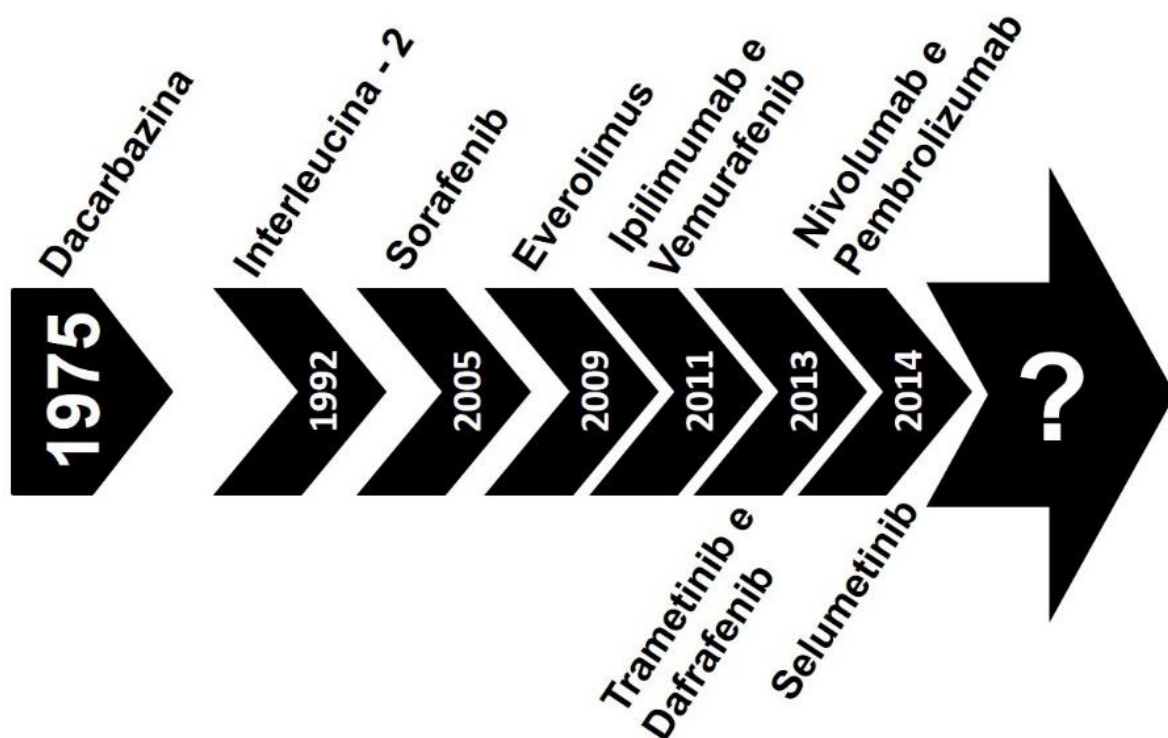


Figura 7: Evolução temporal da aprovação de medicamentos úteis no tratamento do melanoma pela FDA.

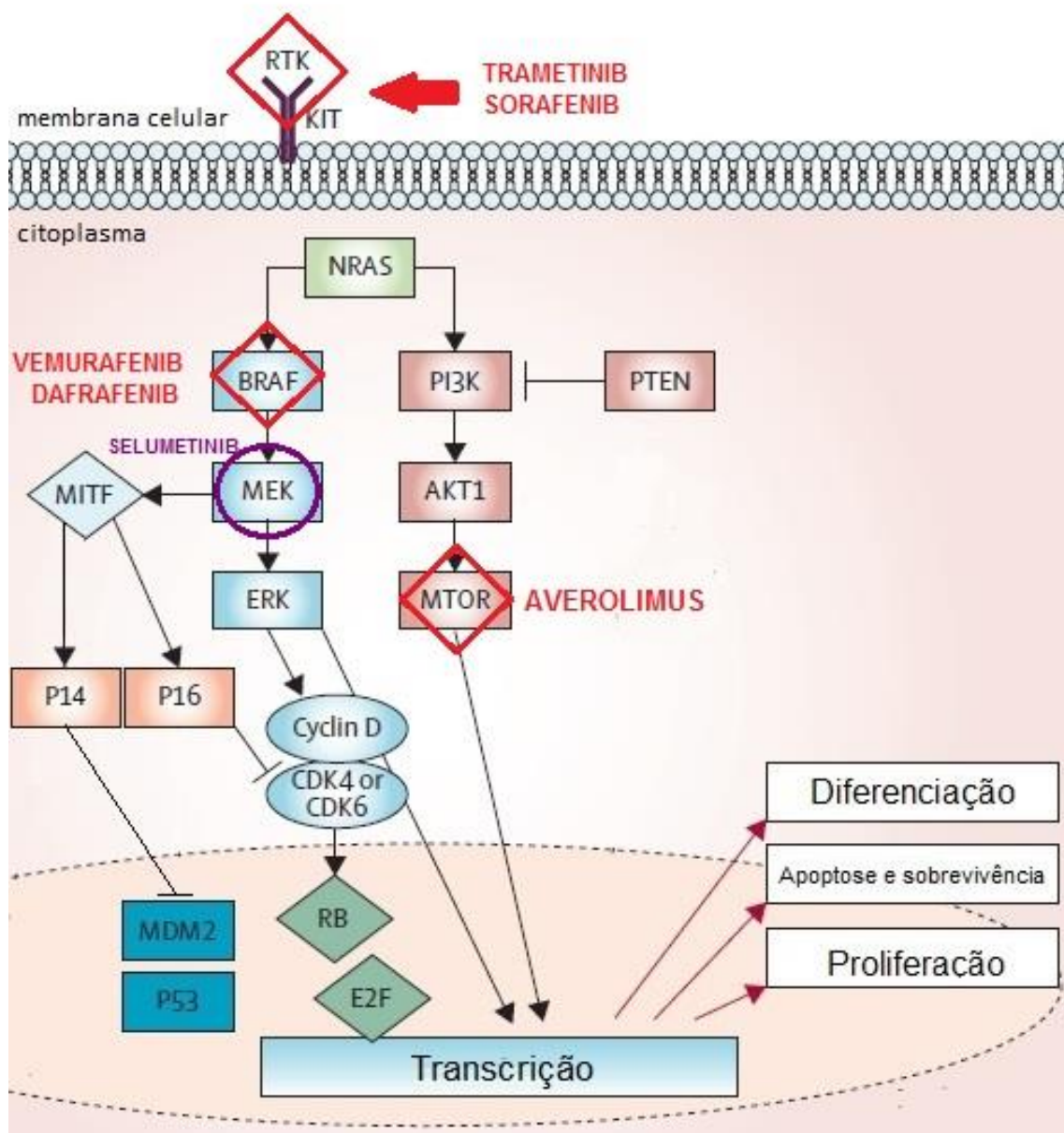


Figura 8: Alvos moleculares da ação dos fármacos trametinib, sorafenib, vemurafenib, dafrafenib, selumetinib e averolimus.

Fonte: Adaptado de EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014.

Para contornar o problema da resistência do melanoma às terapias, novas sugestões de abordagens terapêuticas que fazem uso de combinações de drogas estão surgindo, com associações entre abordagens imunoterápicas, alvo

guiadas e quimioterápicas. No entanto os agentes quimioterápicos disponíveis parecem não ser capazes de gerar dano suficiente para induzir a regressão do tumor, motivo pelo qual a busca de novas alternativas de drogas capazes de deflagrar as diferentes vias de morte celular permanecem necessárias (FOLETTTO; HAAS, 2014; HEPPT *et al.*, 2015).

2.6 Morte celular na terapia antineoplásica

As primeiras descrições de morte celular programada datam de meados da década de 60 (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964). A morte celular pode ser classificada operacionalmente como acidental e regulada. A morte celular acidental (ACD) é causada por injúrias severas, como estímulos físicos (pressão, calor), químicos (pH, detergentes) e mecânicos (corte, ruptura), enquanto a morte celular regulada (RCD) envolve uma maquinaria molecular geneticamente decodificada e controlada. A RCD ocorre não somente como consequência da perturbação do microambiente celular, mas também no contexto do desenvolvimento pós embrionário, da homeostase tecidual e da resposta imune. Nesse contexto fisiológico a morte celular regulada é denominada “morte celular programada” (GALLUZZI *et al.*, 2014).

Usualmente os mecanismos de morte celular regulada são classificados em três tipos principais, em função de suas características morfológicas, a apoptose, a necrose e a autofagia, destacadas na figura 9 (KEPP *et al.*, 2011). Recentemente, com o avanço dos métodos de pesquisa e o acúmulo de novas informações, a comunidade científica tem se esforçado para estabelecer uma nova classificação, baseada nas características bioquímicas dos mecanismos morte celular regulada.

Nesse contexto, a apoptose passa a admitir subclassificações (intrínseca, dependente e independente de caspases, e extrínseca, por receptores de morte ou receptores de dependência), a necrose recebe nova nomenclatura (necroptose), a autofagia passa a ser chamada de morte celular autofágica e o conceito de catástrofe mitótica é definido. As descrições e principais eventos bioquímicos laboratorialmente já identificados relacionados à cada uma dessas modalidades de morte celular regulada estão sintetizados no quadro 1 (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Além de redefinir os mecanismos clássicos, a abordagem bioquímica tem permitido identificar outros subtipos de morte celular regulada, que podem ocorrer em decorrência da falta de interação da célula com a matriz extracelular (anoikis), ou em consequência de um fenótipo *cell-in-cell* (entosis), ou devido à ativação de enzimas poli(ADP-ribose) polimerases (partanatos), ou ainda, serem mecanismos de morte específicos de alguns tipos celulares como macrófagos (piroptose), neutrófilos e eosinófilos (netose) e queratinócitos (cornificação), conforme descrito no quadro 2 (GALLUZZI *et al.*, 2012).

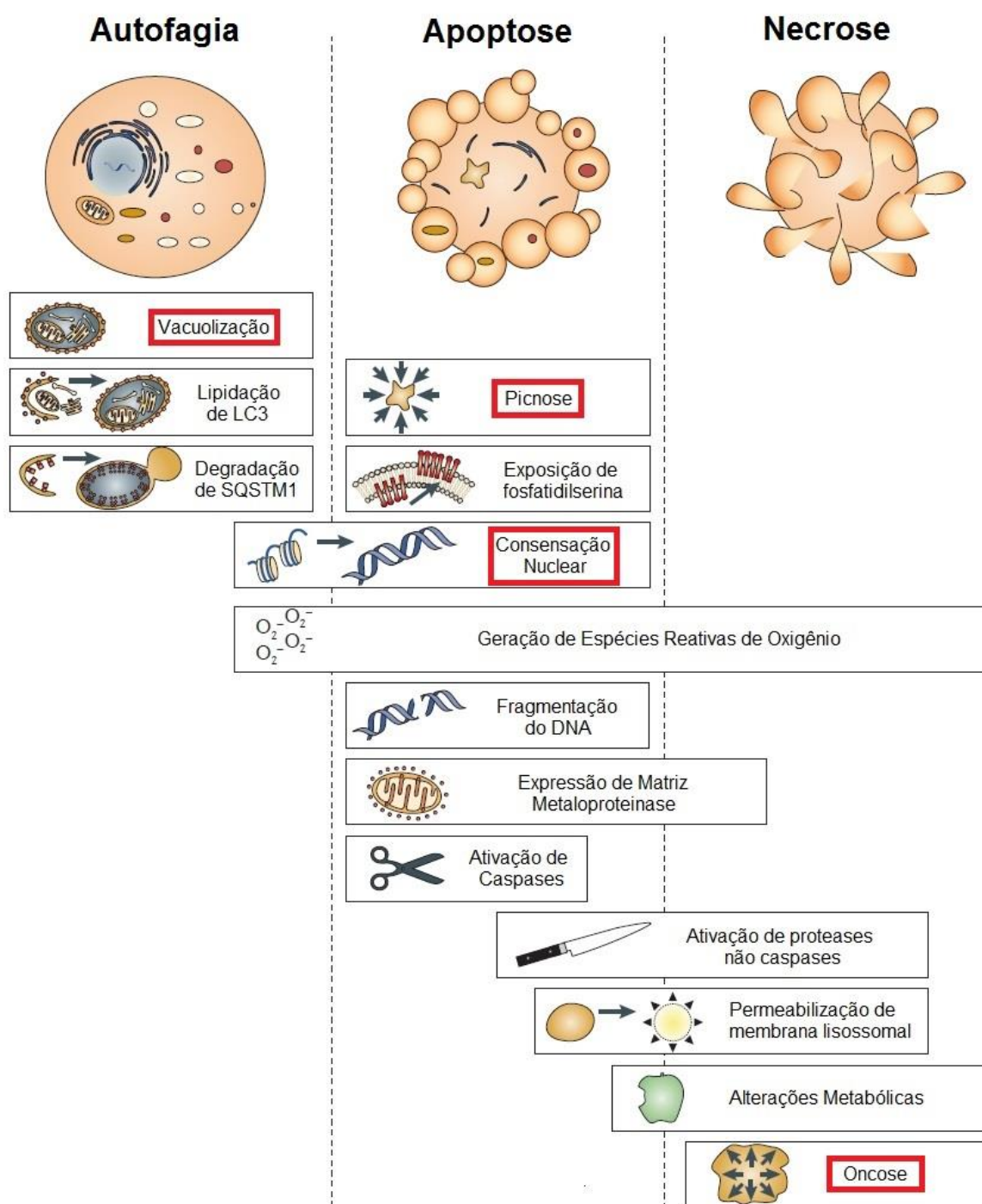


Figura 9: Características morfológicas e eventos moleculares ligados aos mecanismos de morte celular por autofagia, apoptose e necrose.

Fonte: Adaptado de Kepp e colaboradores (2011).

Quadro 1: Nomenclatura dos principais tipos de morte celular com base na classificação bioquímica proposta pelo Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (NCCD) em 2012; descrições correspondentes e principais eventos bioquímicos relacionados.

Tipo de morte	Descrição	Eventos bioquímicos relacionados
Apoptose intrínseca caspase-dependente	Trata-se de uma catástrofe intracelular metabólica e bioenergética centrada no mecanismo de controle mitocondrial, cujas consequências são: a dissipação do potencial transmembrânico mitocondrial, a liberação de proteínas tóxicas do espaço intermembranar da mitocôndria para o citosol e a inibição da cadeia respiratória, que resultam na formação do apoptossomo, que desencadeia a cascata proteolítica caspase-9-3.	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação de proteínas da família BCL-2 (BAX-BAD); - Permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP); - Dissipação irreversível do potencial transmembrânico mitocondrial; - Liberação de proteínas do espaço intermembranar (CYTC, AIF, ENDOG, DIABLO); - Ativação da caspase-9 (-3);
Apoptose intrínseca caspase-independente	Tem particular importância em experimentos <i>in vitro</i> , nos quais, mesmo após a inibição das caspases, a apoptose continua acontecendo. Ocorre pelos mesmos mecanismos iniciais da apoptose intrínseca caspase-dependente, que envolvem a desregulação da função mitocondrial. Por essa via o AIF e a ENDOG funcionam de forma independente, deslocando-se para o núcleo e mediando a fragmentação do DNA, além disso, a HTRA2 promove clivagem de vários substratos celulares, entre eles, o citoesqueleto.	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação de proteínas da família BCL-2 (BAX-BAD); - Permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP); - Dissipação irreversível do potencial transmembrânico mitocondrial; - Liberação de proteínas do espaço intermembranar (CYTC, AIF, ENDOG, DIABLO);
Apoptose extrínseca por receptores de morte	Morte celular induzida por estímulo extracelular deflagrado por ligantes letais (como FASL/CD95L, TNF α , superfamília TNF, TRAIL), na qual os sinais são detectados e propagados por receptores transmembrana específicos, denominados receptores de morte (como FAS/CD95, TNFR1, TRAILR).	<ul style="list-style-type: none"> - Sinalização por receptor de morte; - Ativação de Caspase-8 (-10); - Clivagem de BID; - Permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP); - Ativação de Caspase-3 (-6,-7);
Apoptose extrínseca por receptores de dependência	Morte celular induzida por estímulo extracelular deflagrado por receptores de dependência (como os receptores de netrin, UNC5A-D e DCC), que só exercem função letal quando a concentração de seus ligantes específicos cai abaixo de um limiar crítico.	<ul style="list-style-type: none"> - Sinalização por receptor de dependência; - Ativação de PP2A; - Ativação de DAPK1; - Ativação de Caspase-9; - Ativação de Caspase-3 (-6,-7);

<p>Necroptose</p>	<p>Embora por muito tempo a necrose tenha sido considerada uma morte celular “acidental”, hoje sabe-se que ela pode ocorrer de maneira regulada, sendo deflagrada por agentes alquilantes, excitotoxinas e ativação de alguns receptores de morte (como o TNFR1), que culminam na ativação de proteínas quinases RIP1 e/ou RIP2. O termo necroptose refere-se a essa necrose regulada dependente de RIP1 e/ou RIP3.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sinalização por receptores de morte <ul style="list-style-type: none"> - Inibição de caspase - Ativação de RIP1 e/ou RIP3 (<i>receptor-interacting protein kinase 1 e/ou 3</i>)
<p>Morte Celular Autofágica</p>	<p>A autofagia está mais relacionada ao mecanismo de citoproteção, na qual a célula “recicla” organelas ou porções de citoplasma para reestabelecer a homeostase e continuar sobrevivendo. No entanto, já se sabe que, em algumas situações a autofagia também pode ser um mecanismo letal, no qual os eventos principais envolvem a lipidação da cadeia leve 3 da proteína 1 associada ao microtúbulo ou o aumento da degradação do substrato autofágico semelhante ao sequestrossomo 1. Aceita-se que a morte celular ocorreu por autofagia quando a mesma pode ser inibida por inibidores conhecidos das vias de autofagia.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Lipidação de MAP1LC3 (cadeia leve 3 da proteína 1 associada ao microtúbulo); - Degradação de SQSTM1 (substrato autofágico semelhante ao sequestrossomo 1);
<p>Catástrofe mitótica</p>	<p>A catástrofe mitótica, embora o nome possa sugerir, não é um mero acidente ocorrido durante a divisão celular, mas um mecanismo oncosupressor, caracterizado por perturbações do aparelho mitótico (constituído pelos cromossomos e mecanismos segregadores), que se iniciam durante a fase M do ciclo celular, podendo estar associado a algum grau de parada mitótica, que culmina no desencadeamento de morte celular ou senescência.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação de Caspase-2 (em algumas situações); - Ativação de TP53 or TP73 (em algumas situações); <ul style="list-style-type: none"> - Parada de ciclo celular (fase G2/M);

Quadro 2: Outras definições de modalidades de morte celular baseadas nas recomendações do Comitê de Nomenclatura de Morte Celular de 2012.

Tipo de morte	Descrição	Eventos bioquímicos relacionados
Anoikis	Refere-se à morte celular que ocorre em decorrência da falta de interação da célula com a matriz extracelular. A resistência de células epiteliais cancerígenas à anoikis, confere potencial invasivo e metastático.	<ul style="list-style-type: none"> - Deflagrada pela falta de interação com b1-integrina; - <i>Downregulation</i> de receptor EGFR; - Inibição da sinalização por ERK1; - Aumento da expressão da proteína BIM da família BCL-2; - Ativação de Caspase-3 (-6,-7);
Entosis	Refere-se a fenótipo <i>cell-in-cell</i> , um tipo de canibalismo entre células homotípicas, que pode ser deflagrado pela falta de interação da célula com a matriz extracelular, mas que não resulta em ativação de caspases, como na anoikis, mas no englobamento e “digestão” de uma célula por outra.	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação de RHO; - Ativação de ROCK1;
Partanatos	Refere-se à morte celular deflagrada em decorrência da ativação precoce de enzimas poli(ADP-ribose) polimerases responsáveis por dano ao DNA, denominadas PARPs (sobretudo PARP1). Constitui uma via de morte independente de caspase.	<ul style="list-style-type: none"> - Acúmulo de PARP1- mediado por PAR; - Dissipação irreversível do potencial transmembrânico mitocondrial; - Depleção de ATP e NADH; - Ligação de PAR ao AIF e AIF nuclear; - Translocação;
Piroptose	Ainda não está claro se a piroptose é um tipo de morte celular patricular ou um subtipo de apoptose intrínseca dependente de caspase. Trata-se de morte celular específica de macrófagos infectados.	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação de Caspase-1; - Ativação de Caspase-7; - Secreção de IL-1β e IL-18;
Netose	Em resposta a alguns estímulos, neutrófilos e eosinófilos são capazes de liberar as chamadas NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos), que são estruturas microbicidas. Tem-se observado que esses granulócitos são capazes de sofrer uma morte celular mediada pela liberação de NETs. As células netóticas exibem intensa vacuolização, descondensação rápida da cromatina e ruptura de membrana nuclear e granular. A netose é dependente do maquinário da autofagia e independente de caspase.	<ul style="list-style-type: none"> - Inibição de Caspase; - Ativação oxidativa de NADPH; - Libetação de NETs (em algumas situações);
Cornificação	É um tipo de diferenciação terminal seguido de morte celular que garante a formação do extrato córneo do tecido epitelial. Ela é restrita aos queratinócitos.	<ul style="list-style-type: none"> - Ativação de transglutaminase; - Ativação de Caspase-14;

Fonte: Adaptado de GALLUZZI *et al.* (2012)

Embora possa haver contribuição de variados mecanismos de morte celular programada na terapia antineoplásica, a apoptose, sobretudo a extrínseca por receptores de morte e a intrínseca dependente de caspase, tem sido o mecanismo mais relacionado à citotoxicidade de quimioterápicos e novos compostos de abordagem citotóxica. É importante destacar que esses dois mecanismos apoptóticos culminam na ativação de um executor comum às duas vias, a caspase 3, que, uma vez ativada, promove ativação de endonucleases, degradação de DNA cromossomal, ativação de proteases, degradação do citoesqueleto, reorganização do citoesqueleto, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, externalização da fosfatidilserina, assimetria lipídica e formação de corpos apoptóticos (BROWN; ATTARDI, 2005; ELMORE, 2007; RASTOGI; RICHA; SINHA, 2009).

A apoptose extrínseca por receptores de morte envolve a ativação de receptores transmembrana (como TRAILR1, TRAILR2, FAS e TNFR1), seguida de recrutamento de proteínas intracelulares (FADD ou TRADD) e associação destas com procaspases 8 e 10, o que resulta na autoativação catalítica da procaspase 8, que, uma vez ativada, cliva as caspases efetoras 3 e 7, levando à apoptose. Essa via pode ainda comunicar-se com a via intrínseca através da proteína BID/tBID, que ativa as proteínas BAX e BAK (figura 10). (ELMORE, 2007; GALLUZZI *et al.*, 2014; ICHIM, GABRIEL; TAIT, 2016).

A apoptose intrínseca dependente de caspase pode ser iniciada por uma variedade de estímulos intracelulares, como privação de citocinas, dano ao DNA e ao Retículo Endoplasmático (RE) e estresse oxidativo. Esses diversos estímulos ativam a proteínas próapoptóticas *BH3-only proteins*, que ativam as proteínas BAX e BAK, que deflagram um evento crucial: a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), resultado da formação de poros pela associação de várias proteínas

pró-apoptóticas BAX e BAK ativadas (figura 10). (ELMORE, 2007; RASTOGI, RICHA; SINHA, 2009; GALLUZZI *et al.*, 2014; ICHIM, GABRIEL; TAIT, 2016;).

Após a permeabilização da membrana externa da mitocôndria ocorre a liberação de CYTC, DIABLO/Smac, AIF e ENDOG do espaço intermembranar da mitocôndria para o citosol. O CYTC interage com a APAF1, dATP e pró-caspase 9, presentes no citosol, formando o apoptossomo, que ativa caspase 9, que, por sua vez, ativa a caspase 3 efetora. DIABLO/Smac inibe a proteína inibidora de apoptose (IAP), facilitando ainda mais a ação da caspase 3 (figura 10). Adicionalmente, AIF e ENDOG atuam diretamente no núcleo promovendo degradação do DNA (ELMORE, 2007; RASTOGI; RICHA; SINHA, 2009; OUYANG *et al.*, 2012; GALLUZZI *et al.*, 2014; ICHIM, GABRIEL; TAIT, 2016).

O processo de formação de MOMP é altamente regulado através da interação entre 3 subfamílias de proteínas BCL-2: as proteínas anti-apoptóticas (BCL-2 ou BCL-X, MCL1), as proteínas pró-apoptóticas BH3-*only proteins* (PUMA, BID ou BIM) e as proteínas efectoras pró-apoptóticas (BAX, BAK e BOK). As proteínas anti-apoptóticas BCL-2 desempenham um papel regulador central ao inibir a atividade das pró-apoptóticas (BH3-*only protein*, BAX e BAK). A inibição ou redução da expressão de BCL-2 anti-apoptóticas facilita ainda mais a ocorrência de apoptose (figura 10) (ICHIM, GABRIEL; TAIT, 2016).

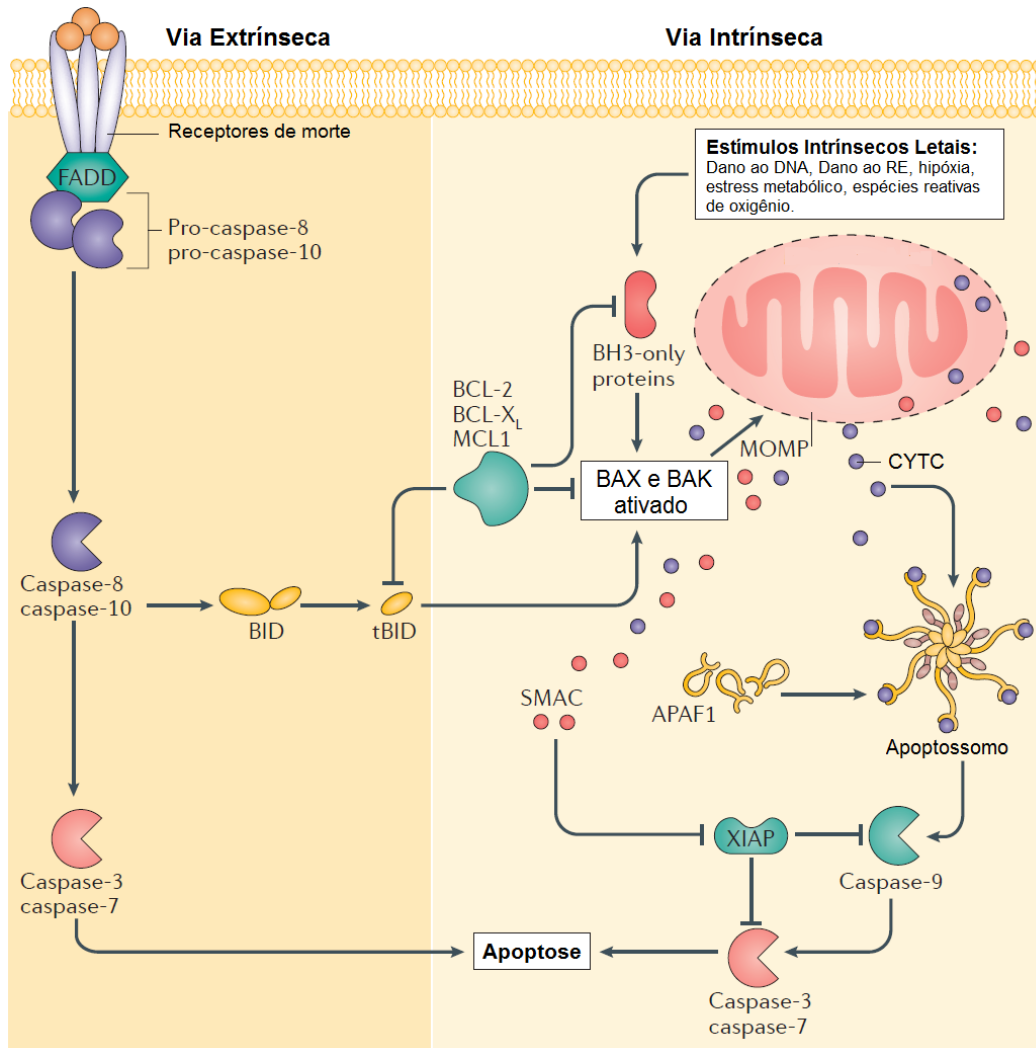


Figura 10: Processos bioquímicos envolvidos na apoptose pela via extrínseca mediada por receptores de morte e pela via intrínseca dependente de caspase.

Fonte: Adaptado de ICHIM, GABRIEL; TAIT (2016)

Embora a morte celular pareça ser um processo linear e irreversível, devido à forma como costuma ser esquematizada, é importante ressaltar que na verdade trata-se de um processo heterogêneo que ocorre de múltiplas formas sobrepostas simultaneamente dentro de uma população celular, sobretudo quando se trata de uma população de células tumorais. A heterogeneidade do processo de morte celular dá a nível de gene (expressão gênica heterogênea e fatores epigenéticos), a nível de via (considerando-se que as vias de morte não são estáticas) e a nível de genoma (devido mutações, translocações e aneuploidias) (STEVENS *et al.*, 2013).

Espera-se sempre se que a morte celular resulte na eliminação da célula, no entanto o processo de morte pode ser interrompido, resultando em morte celular incompleta. Nesse caso podem-se originar extensas alterações genômicas, num processo chamado caos cariotípico, que pode resultar em alterações da célula-alvo, aumento do seu potencial evolucionário e eventual resistência. Mesmo a morte celular completa pode resultar em problemas. Em caso de morte por necrose completa, pode ocorrer danos nas células vizinhas saudáveis, além disso, a reação imunológica deflagrada pode induzir mutações e alterações genômicas. Em caso morte por apoptose completa, pode ocorrer transferência de fragmentos de DNA entre as células através dos *blebs*, o que é especialmente deletério se houver transferência de oncogenes. Há ainda a preocupação a respeito da “proliferação induzida pela apoptose”, na qual células apoptóticas podem promover a proliferação das células circundantes, como em um processo de “cicatrização” (ICHIM, GABRIEL; TAIT, 2016; STEVENS *et al.*, 2013).

Embora todos os fatores relacionados à heterogeneidade da morte celular devam ser considerados, é inegável que a apoptose tem grandes efeitos benéficos na contenção e tratamento do câncer. Por esse motivo, a melhor compreensão do mecanismo apoptótico das drogas é essencial, permitindo aproveitar plenamente seu potencial terapêutico, bem como reconhecer suas limitações e prevenir seus efeitos deletérios (ICHIM, GABRIEL; TAIT, 2016).

2.6.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio e a apoptose

O uso de indutores de estresse oxidativo é uma estratégia conhecida para o tratamento do câncer. O estresse oxidativo tem sido definido como o desbalanço entre o acúmulo de elevados níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou a disfunção dos sistemas de defesa antioxidante. Ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são algumas EROs capazes de reagir e danificar vários alvos moleculares, como DNA, proteínas e lipídeos. O acúmulo intracelular dessas EROs é fator substancial de deflagração da apoptose intrínseca dependente de caspase, bem como de outras vias de morte celular. Tem-se relatado também a importância das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) nesse processo, entre elas destacam-se o óxido nítrico (NO^{\cdot}), o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Embora os efeitos celulares relacionados à indução de morte por espécies reativas de nitrogênio sejam menos estudados, há evidências de que elas desempenham papel semelhante ao das espécies reativas de oxigênio (MEIERJOHANN, 2014; MODICA-NAPOLITANO; WEISSIG, 2015).

Os efeitos diretos de EROs sobre a morte celular incluem a ativação ou inibição de proteínas da família BCL-2 (como BAX), da família MAPK (como p38, JNK e ERK) e da via Akt/PBK. Além disso, EROs podem induzir alterações moleculares em CYTC, APAF1 e caspase 9, tornando-as ainda mais eficazes na execução da apoptose (WU; BRATTON, 2013).

O efeito da ativação de JNK depende do nível e da duração do estímulo e parece ser essencial para a promoção de morte completa por espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Várias vias prováveis para essa ativação têm sido investigadas, sendo a via que envolve o intermediário ASK1 a mais relatada. Os efeitos nucleares

de JNK envolvem a ativação de AP-1, que media a expressão das proteínas pró-apoptóticas TNF α , Fas-L e BAK. Seus efeitos mitocondriais envolvem a inibição de BCL-2, o que permite a permeabilização da membrana mitocondrial externa e, conseqüentemente, a liberação de CYTC, ativando toda a via de apoptose intrínseca dependente de caspase (figura 10) (LIU, 2006; CIRCU; AW, 2010; SHEN; WU; BRATTON, 2013).

A ativação de JNK pode levar à ativação de p38 que desempenha papel na regulação da expressão gênica transcricional e pós-transcricional, influenciando, entre outros fatores, no processo inflamatório, no ciclo celular, na diferenciação celular, na senescência e na morte celular. O efeito pró apoptótico da p38 se dá pela fosforilação e translocação de proteínas da família BCL-2, que desempenham papel essencial na apoptose pela via intrínseca (figura 10) (HAN, 2005; LENASSI; PLEMENITAS, 2006; SUI *et al.*, 2014; ZARUBIN).

A MAPK ERK é ativada diretamente por EROs. Ela faz parte da via RAS/RAF/ERK que regula inúmeros efeitos celulares, entre eles a senescência. ERK está ainda presente na membrana mitocondrial, podendo interferir diretamente na função da organela, induzindo redução do funcionamento da cadeia respiratória e alterando seu potencial de membrana. ERK também promove liberação de CYTC, ao modular a transcrição de BCL-2, aumentando a expressão dos membros pró apoptóticos dessa família. A morte celular mediada por ERK depende do prolongamento dessa ativação e da presença de EROs para acontecer (CAGNOL; CHAMBARD, 2010).

O papel das MAPK no câncer é tão variável quanto o próprio câncer e, embora haja um ampla diferença de expressão dessas proteínas nos tumores, elas parecem

ser essenciais quando se trata de sensibilidade e sucesso da terapia medicamentosa, podendo estar envolvidas em diversos mecanismos de morte celular (SUI *et al.*, 2014).

Finalmente, há estudos que indicam que EROs/ ERNs são capazes de induzir dano ao DNA em decorrência da ativação de poli(ADP-ribose)polimerase (PARP), promovendo o tipo de morte hoje denominada partanatos, além de estarem também envolvidos na necroptose e autofagia (CHAABANE *et al.*, 2013; NIKOLETOPOULOU *et al.*, 2013; DHAWAN, 2014; GALLUZZI *et al.*, 2014; SU *et al.*, 2015).

2.7 Nitroestirenos

Na busca por novas alternativas quimioterápicas, o desenvolvimento de substâncias seletivas para células tumorais, com alta eficácia e amplo espectro de ação, é o objetivo a ser alcançado. Fontes naturais de substâncias químicas já possibilitaram a introdução de diversas moléculas na terapêutica antitumoral, assim como fontes sintéticas também deram origem a substâncias bioativas úteis no tratamento do câncer (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

Nitrocompostos têm seu potencial biológico relatado desde a década de 40. Alguns nitrocompostos já são atualmente utilizados na clínica como antianginosos (nitroglicerina, tetranitrato de eritritila, dinidrato de isossorbida), anti-hipertensivos (nifedipina, nitredipina e niguldipina), imunossupressores (azatioprina), anticoagulantes (acenocumarol), antiparasitários (metronidazol; tinidazol, benzinidazol, nifurtimox, dimetridazol, 4-nitromegazol, nitrofurazona e furazolidona), sedativos hipnóticos (clonazepam, flunitazepam, nitrazepam), anti-inflamatórios

(nimesulida), anti-histamínicos H-2 (granitidina, nizatidina), antibacterianos (clorafenicol, azidanfenicol, nirofural, nifuroxazida) e, até mesmo, como antineoplásicos (nitacrina, nitroacridina, lomustina, nimustina, semustina) (MORENO; DOCAMPO, 1985; NIKOLOVA *et al.*, 2017; PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009).

O mecanismo de ação citotóxica dos nitrocompostos não está totalmente elucidado. No entanto, a maioria dos nitrocompostos com ação antineoplásica, antiparasitária e antibacteriana, apresenta o processo de biorredução enzimática do grupo nitro como provável mecanismo de ação. Esse processo envolve diferentes intermediários e derivados reativos, como por exemplo, o radical dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot}), óxido nitroso (NO^{\cdot}), hidroxilamina (H_3NO), cátion-radical amino ($\text{NH}_2^{+\cdot}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas (OH^{\cdot}), entre outros, que são capazes de provocar danos ao DNA, entre outros efeitos intracelulares, resultando em toxicidade para células bacterianas, parasitárias ou cancerígenas (MORENO; DOCAMPO, 1985; MAYA *et al.*, 2007; PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009).

Quando se trata especificamente de compostos nitroestirenos, o primeiro trabalho encontrado no *pubmed* data de 1948, o primeiro que relata atividade biológica (anticândida) foi publicado em 1970 e o primeiro que avaliou esse grupo de moléculas numa abordagem anticâncer é de 1975 (STEWART; CLARK, 1948; BILICH; CHERKASOV; VLADIMIRTSEV, 1970; DORÉ; VIEL, 1975).

Desde então, muitas ações biológicas tem sido atribuídas aos nitroestirenos, tais como: anti-inflamatória e antiplaquetária (CARTER *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2007a; VILLAR *et al.*, 2008b; HSIEH *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2014), antimicrobiana (BILICH; CHERKASOV; VLADIMIRTSEV, 1970; MIKAMI *et al.*, 1991; MILHAZES *et al.*, 2006; PETTIT *et al.*, 2009a AL MAJID *et al.*, 2014), atividade sobre o sistema

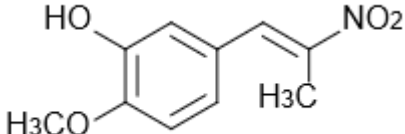
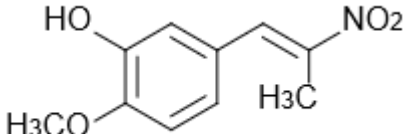
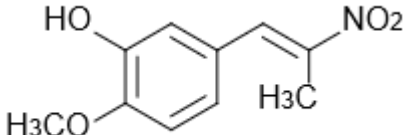
nervoso central (LETAVIC *et al.*, 2007), ações citotóxica/anticâncer (DORÉ; VIEL, 1975; KAAP *et al.*, 2003; PETTIT *et al.*, 2009a; MCNAMARA *et al.*, 2011; MESSERSCHMITT *et al.*, 2012; RAHMANI-NEZHAD *et al.*, 2014a CHEN *et al.*, 2015a, 2015b; CHIU *et al.*, 2016; TSAI *et al.*, 2016), ação pró-apoptótica (WERNER; EGER; JÜRGEN STEINFELDER, 2007), ação pró-autofágica (CALGAROTTO *et al.*, 2012a) e atividades sobre enzimas e proteínas, com destaque para o potencial inibitório sobre telomerase, tirosinoquinase e receptor de tirosinoquinase (TRAXLER *et al.*, 1991; KIM *et al.*, 2003a; PARK; PEI, 2004; KUETHE *et al.*, 2005; WANG; WU; WU, 2006; BARTELS *et al.*, 2014).

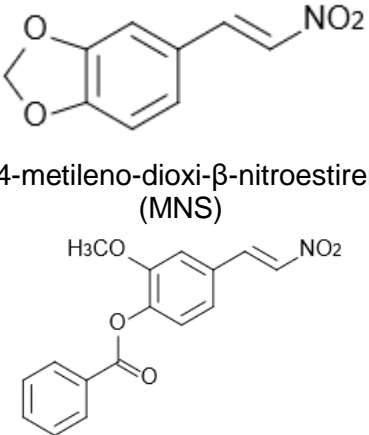
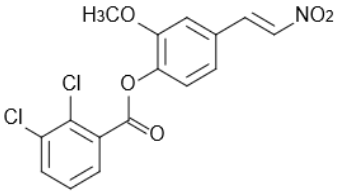
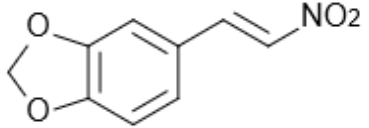
A atividade anti-inflamatória atribuída à classe dos nitroestirenos merece destaque. No trabalho de Villar e colaboradores (2008) diversos derivados nitroestirenos foram sintetizados, entre eles o 1-cloro-((*E*)-2-nitrovinil)-benzeno, cujo nome IUPAC é 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano, com o objetivo de avaliar o potencial de inibição da fosfolipase A₂ (PLA₂) obtida do veneno de *Bothrops jararacuçu*. Na ocasião, o composto 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano apresentou ação antiedematogênica, reduziu a miotoxicidade, e apresentou uma discreta redução da atividade enzimática da PLA₂ de maneira não competitiva, no entanto não foi o composto que apresentou melhor perfil de ação entre os avaliados.

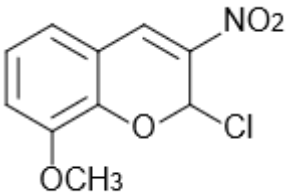
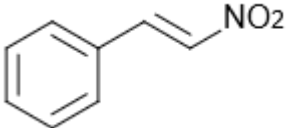
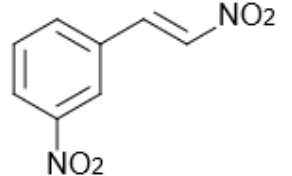
Alguns nitroestirenos já possuem também atividades bem descritas sobre eventos ligados à evolução maligna de células. Estudos demonstram que o composto 4-metilenodioxo-β-nitroestireno foi capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por células tumorais, inibir a agregação de plaquetas em células tumorais, inibir a adesão de células TNBC a diferentes componentes da matriz extracelular e inibir a motilidade, migração, invasão e formação de colônias de osteoclastos, efeitos relacionados a um potencial efeito antimetastático (MESSERSCHMITT *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015a;

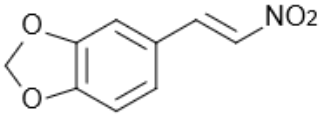
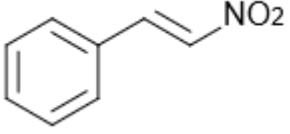
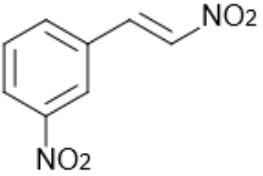
WEI *et al.*, 2015). Derivados do composto 3,4-metilenodioxib-nitroestireno apresentaram ainda atividade citotóxica sobre painel de células tumorais e a capacidade de restaurar a sensibilidade da célula MDA-MB-231 à *anoikis*, promovendo apoptose mediada por caspases nas células suspensas (PETTIT *et al.*, 2009b; CHEN *et al.*, 2015b). O derivado nitroestireno CYT-Rx20 induziu apoptose e inibiu a migração e invasão de células de câncer de esôfago, bem como reduziu o crescimento tumoral em modelos xenográfico e ortotópico (CHIU *et al.*, 2016), adicionalmente, esse composto induziu parada de ciclo celular na fase G2/M, apoptose e autofagia de células de câncer de mama, e inibiu o crescimento tumoral ortotópico (HUNG *et al.*, 2016). Essas e outras publicações mais relevantes da última década acerca de atividades antineoplásicas relacionadas a compostos nitroestirenos estão sintetizadas no quadro 3.

Quadro 3: Publicações relevantes a cerca de atividades citotóxicas/ antineoplásicas relacionadas a compostos nitroestirenos.

Título/ Autor/ Revista	Composto	Resultados Encontrados
<p>3'-Hydroxy-4'-methoxy-β-methyl-β-nitrostyrene inhibits tumor growth through ROS generation and GSH depletion in lung cancer cells.</p> <p>(TSAI <i>et al.</i>, 2016)</p> <p>Life Sciences</p>	 <p>3'-hidroxi-4'-metoxi-β-metil-β-nitroestireno (CYT-Rx20)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Induz acúmulo de EROs; - Reduz os níveis intracelulares de glutationa; - Induz citotoxicidade, ativação de caspases, apoptose e despolarização mitocondrial; - Inibe a motilidade e migração; - Causa parada de ciclo celular na fase G2/M; - Parte dos efeitos podem ser revertidos pelo pré-tratamento com antioxidante; - Promove redução do percentual de crescimento tumoral <i>in vivo</i> em modelo xenográfico;
<p>The synthetic β-nitrostyrene derivative CYT-Rx20 induces breast cancer cell death and autophagy via ROS-mediated MEK/ERK pathway.</p> <p>(HUNG <i>et al.</i>, 2016)</p> <p>Cancer Letters</p>	 <p>3'-hidroxi-4'-metoxi-β-metil-β-nitroestireno (CYT-Rx20)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Induz parada de ciclo celular na fase G2/M em células de câncer de mama - Induz apoptose mediada por caspases e PARP; - Induz autofagia; - Induz a formação de espécies reativas de oxigênio e a expressão de fosfo-ERK1/2, ATG5, Beclin-1 e LC-3; - Parte dos efeitos podem ser revertidos pelo pré-tratamento com antioxidante; - Inibe o crescimento tumoral ortotópico;
<p>The Synthetic β-Nitrostyrene Derivative CYT-Rx20 Inhibits Esophageal Tumor Growth and Metastasis via PI3K/AKT and STAT3 Pathways.</p> <p>(CHIU <i>et al.</i>, 2016)</p> <p>PLoS One</p>	 <p>3'-hidroxi-4'-metoxi-β-metil-β-nitroestireno (CYT-Rx20)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Induz citotoxicidade sobre células de câncer de esôfago. - Induz de apoptose por ativação da cascata de caspases e quebra da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) - Inibe a motilidade e migração celular; - Inibe o crescimento tumoral em modelo xenográfico e ortotópico; - Reduz da expressão de Ki-67, fosfo-AKT e fosfo-STAT3;

<p>Inhibition of the interactions between metastatic human breast cancer cells and platelets by β-nitrostyrene derivatives.</p> <p>(WEI <i>et al.</i>, 2015)</p> <p>Life Sciences</p>	 <p>3, 4-metileno-dioxi-β-nitroestireno (MNS)</p> <p>4-O-benzoil-3-metoxil-β-nitroestireno (BMNS)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Inibição da agregação plaquetária induzida por células tumorais e da adesão das plaquetas nas células tumorais (MDA-MB-231, Hs578T e MCF-7); - Inibição da expressão de P-selectina e da secreção de PDGF;
<p>HPW-RX40 restores anoikis sensitivity of human breast cancer cells by inhibiting integrin/FAK signaling.</p> <p>(CHEN <i>et al.</i>, 2015b)</p> <p>Toxicology And Applied Pharmacology</p>	 <p>HPW-RX40 (derivado do MNS)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Restaura a sensibilidade da célula à anoikis; - Inibe a agregação celular; - Induz de morte por ativação da cascata de caspases e quebra da poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) em MDA-MB-231 suspensas;
<p>3,4-Methylenedioxy-β-nitrostyrene inhibits adhesion and migration of human triple-negative breast cancer cells by suppressing β1 integrin function and surface protein disulfide isomerase.</p> <p>(CHEN <i>et al.</i>, 2015a)</p> <p>Biochimie</p>	 <p>3, 4-methyenedioxy-β-nitrostyrene (MNS)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Inibe a adesão de células TNBC a diferentes componentes da matriz extracelular; - Inibe a migração e invasão;

<p>Synthesis, <i>in vitro</i> cytotoxicity and apoptosis inducing study of 2-aryl-3-nitro-2H-chromene derivatives as potent anti-breast cancer agents.</p> <p>(RAHMANI-NEZHAD <i>et al.</i>, 2014b)</p> <p>European Journal of Medicinal Chemistry</p>	 <p>8-methoxy-3-nitro-2-(4-chlorophenyl)-2H-chromene (4I)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Induz citotoxicidade em células MCF-7; - Induz apoptose por ativação de caspase 3;
<p>Differential effects of nitrostyrene derivatives on myelopoiesis involve regulation of C/EBPα and p38MAPK activity.</p> <p>(BARTELS <i>et al.</i>, 2014)</p> <p>PLoS One</p>	 <p>1-((E)-2-nitrovinyl) benzene (NTS1)</p>  <p>1-nitro-3-((E)-2-nitrovinyl) benzene (NTS2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Estimula a mielopoiese <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>; - Estimula a reconstrução mielóide pós-quimioterapia. - Induz aumento da expressão e atividade de C/EBPα; - Inibe a via de sinalização p38 MAPK;

<p>Osteosarcoma Phenotype Is Inhibited by 3,4-Methylenedioxy-β-nitrostyrene.</p> <p>(MESSERSCHMITT <i>et al.</i>, 2012)</p> <p>Sarcoma</p>	 <p>3,4-methylenedioxy-β-nitrostyrene (MNS)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Reduz a motilidade, a formação e a sobrevivência de colônias de osteoblastos de maneira tempo-dependente e concentração-dependente;
<p>Autophagy inhibited Ehrlich ascitic tumor cells apoptosis induced by the nitrostyrene derivative compounds: relationship with cytosolic calcium mobilization.</p> <p>(CALGAROTTO <i>et al.</i>, 2012a)</p> <p>Journal of Pharmacology European</p>	 <p>1-((E)-2-nitrovinyl) benzene (NTS1)</p>  <p>1-nitro-3-((E)-2-nitrovinyl) benzene (NTS2)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Induzem apoptose por ativação de caspase 3 em células de tumor ascítico (EAT); - Induzem autofagia; - Alteram o potencial transmembrânico mitocondrial; - Promovem mobilização de Ca²⁺ citosólico;

Atentos ao potencial biológico dos nitroestirenos, uma série de derivados do 1-nitro-2-feniletano foi sintetizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará com o intuito de investigar as atividades anti-inflamatórias dos compostos obtidos. Entre eles está o derivado β -nitroestireno: 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano, denominado 7E (VALE, 2011; OLIVEIRA, 2014).

O composto 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano foi sintetizado por meio da reação de condensação aldólica usando nitrometano, *p*-clorobenzaldeído, em mistura alcalina de hidróxido de sódio em água e etanol (1:1) (Figura 11). A purificação do nitrocomposto foi realizada por meio do teste de recristalização e a identificação estrutural foi evidenciada por análises espectrométricas de absorção do Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio. O critério utilizado para validar o teor de pureza foi verificado pelo intervalo da faixa de fusão, baseado no padrão de referência da Sigma-Aldrich®. Os espectros de absorção pelo Infravermelho (IV) foram obtidos por espectrofotômetro de infravermelho (Prestige21), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr).

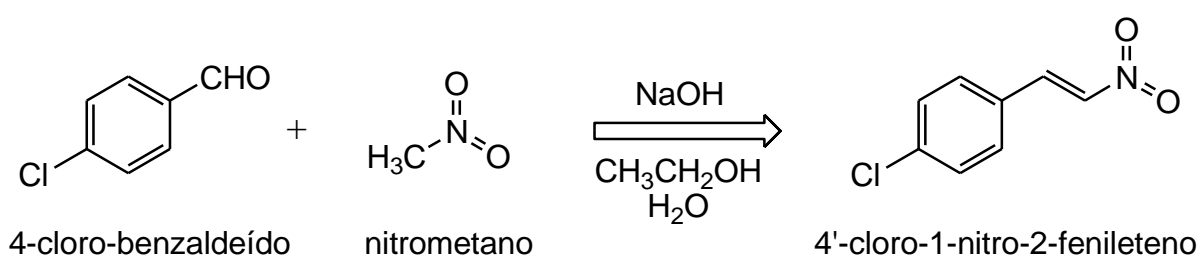


Figura 11: Síntese do 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano (7E).

Testes protocolares de segurança celular *in vitro* levantaram a suspeita acerca do potencial citotóxico do composto 7E sintetizado. Embora existam sólidos indicativos da atividade anticâncer da classe dos nitroestirenos, não foram

identificados na literatura estudos descrevendo nenhum potencial antitumoral do composto 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano. Sendo assim, no presente estudo, investigou-se a atividade citotóxica e os possíveis mecanismos de morte celular decorrentes do tratamento *in vitro* de células de melanoma humano (SK-MEL-3) com o composto 7E, bem como a sua eficácia e toxicidade sistêmica em modelo *in vivo* de melanoma murino.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* de derivado 4'-cloro-1-nitro-2-feniletano em modelos de melanoma.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do derivado nitroestireno selecionado (7E) sobre linhagens celulares neoplásicas e não neoplásicas;
- Investigar o tipo de morte celular induzido pelo composto 7E em linhagem de melanoma cutâneo;
- Verificar a modulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em células de melanoma cutâneo tratadas com o composto 7E;
- Avaliar expressão de genes relacionados a mecanismos citotóxicos em células de melanoma cutâneo tratadas com o composto 7E;
- Avaliar a toxicidade sistêmica do composto 7E *in vivo*;
- Investigar a atividade antitumoral do composto 7E *in vivo*;

4 METODOLOGIA

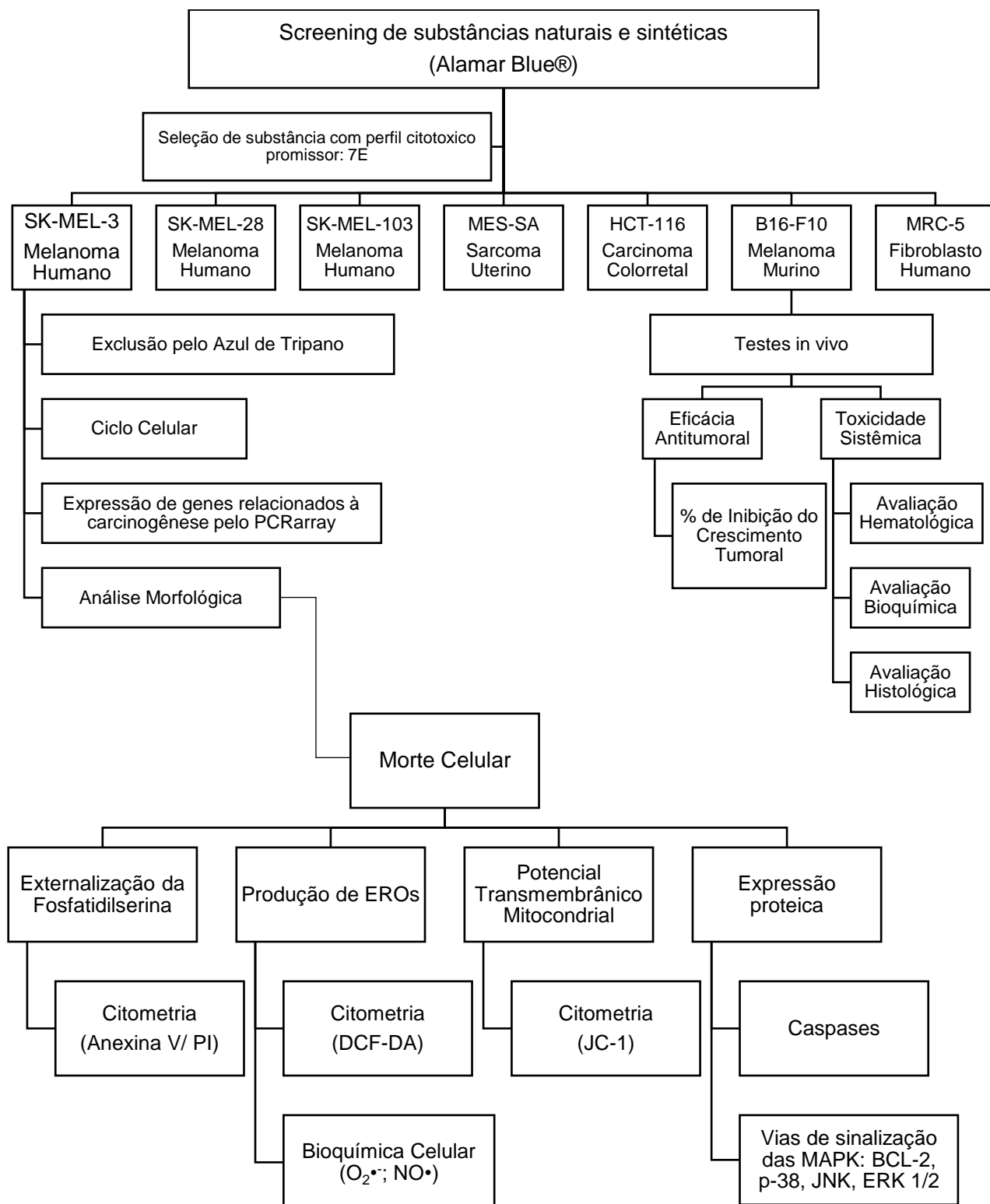


Figura 12: Descrição esquemática do fluxograma metodológico.

Os protocolos experimentais descritos na figura 12 foram realizados nos Laboratório de Atividades Biológicas (BIOPHAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, no Laboratório de Engenharia de Tecidos e Imunofarmacologia do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-Bahia) e no Laboratório de Sinalização em Inflamação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.1 Cultura Celular

A manutenção e manipulação das linhagens celulares ao longo de todo trabalho experimental obedeceu os critérios estabelecidos pelos guias de cultura celular. Foram utilizadas garrafas e placas de cultura celular de polipropileno estéreis, meio de cultura *Dubelco's Modified Eagle Medium* (DMEM) acrescido de bicarbonato de sódio (5,6%), HEPES (25 mM), estreptomicina (0,005 mg/L), penicilina (0,001 U/L) e soro fetal bovino (10-20%) (Gibco by Life Technologies). As culturas foram mantidas sob incubação a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ (FRESHNEY, 2007).

4.2 Obtenção do composto

O derivado β -nitroestireno 7E foi produzido e cedido pelo Laboratório de Química Farmacêutica da Universidade Federal do Pará por meio da parceria com o professor Dr. Rosivaldo dos Santos Borges.

4.3 Linhagens celulares

As linhagens celulares de melanoma humano, SK-MEL-3, SK-MEL-28 e SK-MEL-103, cujas características estão apresentadas na tabela 1, foram obtidas a partir de cultura primária gentilmente doadas pela Profa. Dra. Silvyia Stuchi Maria-Engler da Universidade de São Paulo (USP). As demais linhagens (MRC5, fibroblasto humano; MES-SA, sarcoma uterino humano; HCT-116, carcinoma colorretal humano; B16F10, melanoma murino) foram adquiridas do banco de células ATCC.

Tabela 1: Características moleculares das linhagens celulares de melanoma, SK-MEL-3, SK-MEL-28 e SK-MEL-103.

Tipo celular/ Linhagem	p53	p53 induzido	p14 (RNAm)	p16 (RNAm)	B-RAF (V ⁶⁰⁰ E)	N-Ras (éxon 3)	Apaf-1 (prot)	Casp8 (prot)	Bcl-2 (prot)	Bcl-xL (prot)	Mcl1 (prot)
SK-MEL-3	wt	+	+	+'	Mutante	Wt	++	++	+++	++	
SK-MEL-28	R273H ^R	-*	ND	+'	mutante	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 (V600E): mutação ocasionada pela substituição de timina por adenina, no códon 1796 (A1796T), resultando na substituição de valina por ácido glutâmico no códon 600;
- 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.

4.4 Avaliação da citotoxicidade

4.4.1 Ensaio de Alamar Blue®

Para a realização desse teste as células foram cultivadas em uma densidade de 1×10^4 células/poço em placas com 96 cavidades, essas placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24h para que ocorresse a adesão das células. Após esse período as células foram tratadas em triplicata com 7 concentrações seriadas do β-nitroestireno 7E, 20-0,3125 μg/mL, e DMSO (10 μL/mL).

Após 24, 48 e 72h do tratamento, adicionamos 10 μL do reagente rezasurina (Alamar Blue®) 0,02% em cada poço da placa e, após duas horas exposição, a leitura da fluorescência das placas foi processada em leitor de microplaca nos comprimentos de onda em 465 nm e 540 nm. A concentração letal 50 foi então calculada através de regressão não linear tipo sigmoideal utilizando-se o software graphpad prism 5.

A conversão de rezasurina em rezofurina pelas enzimas mitocondriais, citosólicas e microssomais das células reflete a viabilidade das mesmas, assim determinou-se a concentração inibitória capaz de provocar a morte ou a inativação metabólica de 50% das células cultivadas em análise de acordo com metodologia proposta por Ansar Ahmed; Gogal; Walsh (1994). Esse parâmetro inicial forneceu dados a respeito do perfil citotóxico do composto sobre as linhagens MRC-5, SK-MEL-3, SK-MEL-28, SK-MEL-103, MES-SA, HCT-116 e B16F10, de fibroblasto normal, melanoma (BRAF^{V600E}; P53^{wt}, NRAS^{wt}), melanoma (BRAF^{V600E}; P53^{R273H}, NRAS^{wt}), melanoma (BRAF^{wt}; P53^{wt}, NRAS^{Q61R}), sarcoma uterino, carcinoma colorretal e

melanoma murinho, respectivamente. Esses dados nortearam a escolha da concentração e dose do composto em ensaios posteriores.

4.4.2 Ensaio de Azul de Tripiano

Com o intuito de avaliar viabilidade celular realizamos o ensaio de exclusão pelo Azul de Tripiano (RENZI *et al.*, 1993 apud MONTENEGRO *et al.*, 2007), no qual as células foram cultivadas em placas de 24 poços (14×10^4 /poço) e, posteriormente, tratadas com três diferentes concentrações de 7E (1, 3 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), além do controle negativo, tratado com DMSO (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$), todos em triplicata.

Após 24 e 48h de tratamento, o sobrenadante dos poços foi coletado em um eppendorf, assim como as células, soltas por tripsinização. Essa solução resultante foi cautelosamente homogeneizada e uma alíquota de 90 μL foi coletada e misturada a 10 μL de corante azul de tripiano[®]. Após 2 minutos de repouso, uma alíquota de 10 μL dessa suspensão de células foi transferida para uma câmara de Neubauer para a realização da contagem das células contidas nos 4 quadrantes externos em microscópio óptico. Durante essa contagem é possível diferenciar células viáveis e não viáveis, uma vez que elas se apresentam transparentes ou coloradas em azul, respectivamente.

A análise de variância *1way* com pós teste de Tukey, realizada com o auxílio do software graphpad prism5 determinou se houve diferença estatística na viabilidade celular frente aos tratamentos nos diferentes tempos de exposição.

4.4.3 Análise do Ciclo Celular

Conforme descrito por Krishan (1975), a quantificação do conteúdo de DNA marcado por iodeto de propídeo reflete as fases do ciclo celular. Em placas de 24 poços contendo 15×10^4 células/poço foram realizados tratamentos com o beta-nitroestireno 7E nas concentrações de 1, 3 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DMSO (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) e ETO (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o etoposídeo foi utilizado como controle positivo em alternativa à doxirrubicina em experimentos no qual a cor da droga interferiu no resultado obtido, como em algumas análises colorimétricas e de fluorescência. Decorridas 24 h do tratamento, o sobrenadante e as células aderidas foram coletadas em tubos de citometria mantidos em gelo, centrifugadas (2500 rpm/5' / 4°C), lavadas duas vezes com solução salina 0,9% gelada e centrifugadas novamente para obtenção do pellet de células.

Os pellets foram ressuspensos em 200 μL de solução de lise (0,1 % de triton X-100 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iodeto de propídeo em PBS), incubados em gelo no escuro por 30 minutos e analisados em citômetro FORTEZA (BD-USA) (1000 eventos). Os resultados foram analisados com o auxílio do software FolwJo v.10.

4.5 Avaliação do tipo de morte celular

4.5.1 Análise Morfológica

Com o intuito de avaliar a ocorrência de alterações morfológicas nas células, cultivamos 14×10^4 células/poço em placas de 24 poços e tratamos com 1, 3 e 10

$\mu\text{g/mL}$ do beta-nitroestireno 7E, 4 $\mu\text{g/mL}$ de doxorubicina (DOXO), 4 $\mu\text{g/mL}$ de Etoposídeo (ETO) e DMSO (10 $\mu\text{L/mL}$) (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Em seguida, após 24 e 48h, o sobrenadante dos poços foi coletado em um eppendorf, assim como as células, soltas por tripsinização. Retiramos uma alíquota de 100 μL e cetrifugamos 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 feito por fotografia em microscópio óptico (Olympus CX41).

4.5.2 Ensaio de anexina/PI por citometria de fluxo

O ensaio por citometria de fluxo, descrito por Riccardi e Nicoletti (2006), foi realizado utilizando-se o *kit Annexin V:FITC apoptosis detection* (BD Pharmingen), de acordo com as recomendações do fabricante.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços (14x10⁴/poço), mantidas em condições de cultivo por 24 horas e, posteriormente, tratadas com o beta-nitroestireno 7E nas concentrações de 1, 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$, etoposídeo (4 $\mu\text{g/mL}$) e DMSO (10 $\mu\text{L/mL}$). Após 24 e 48 h de tratamento, o sobrenadante e as células aderidas foram coletadas em tubos de citometria mantidos em gelo, centrifugadas (2500 rpm/5' 4°C), lavadas duas vezes com solução salina 0,9% gelada e centrifugadas a 2500 rpm/ 5'/ 4°C para obtenção do pellet de células. Os pellets foram ressuspensos em 100 μL de tampão de ligação no qual foi adicionado 5 μL da solução de anexina-V e 5 μL da

solução de iodeto de propídeo. Foi feita a leitura de 1000 eventos utilizando-se o citômetro FORTEZA (BD-USA). Os resultados foram analisados com o auxílio do software FolwJo v.10.

4.5.3 Identificação de EROs por citometria de fluxo

Para determinação da produção de EROs pela sonda DCFDA (2'-7'-doclorohidrofluoresceína diacetato) as células foram cultivadas em placas de 24 poços (14×10^4 /poço) por 24 h e tratadas por 3 h com DMSO (10 μ L/mL), H₂O₂ e 1, 3 e 10 μ g/mL de 7E. Posteriormente o sobrenadante e as células aderidas foram coletadas, centrifugadas (2500 rpm/5'/4°C°), ressuspensas em 1 mL de salina contendo 20 μ M de DCFDA e incubadas por 30 min a 37°C. Após esse período, a suspensão de células foi centrifugada a 2500 rpm/4°C, ressuspensa em 300 μ L de salina e 1000 foram analisados no citômetro FORTEZA (BD-USA) (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010). Os resultados foram analisados através do software FolwJo v.10 .

4.5.4 Produção do ânion superóxido (O₂^{•-})

Avaliamos a produção de superóxido celular através do método modificado de conversão do sal *nitroblue tetrazolium* (NBT), de cor amarela, em seu derivado formazan reduzido, de cor azul (SIM CHOI *et al.*, 2006). $1,0 \times 10^4$ células foram cultivadas em cada poço de uma placa de 96 poços e, após 24 h, incubadas com DMSO (10 μ L/mL) e 7E (1, 3 e 10 μ g/mL) mais 20 μ L de NBT 2% por 1, 3 e 6 h. Decorrido o tratamento, retiramos o sobrenadante, adicionamos 200 μ L de DMSO por poço (para diluir o formazan) e realizamos a leitura a 570 nm em leitor de microplaca.

4.5.5 Produção de óxido nítrico (NO•)

Para a quantificação indireta da produção de NO•, as células foram cultivadas em placas de 96 poços (1 x 10⁴/poço), 24 h depois, tratadas com DMSO (μL/mL) e 7E (1, 3 e 10 μg/mL) por mais 24h. Após a incubação, a concentração de nitrito (NO₂⁻) foi determinada adicionando-se 100 μL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida + 0,1% de α-naftil etilenodiamina, preparado no momento do uso) a 50 μL do sobrenadante proveniente da cultura tratada. A reação foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e as absorbâncias registradas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550 nm. A concentração de nitrito (NO₂⁻) foi determinada através da plotagem dos resultados obtidos em curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) (GRISHAM; JOHNSON; LANCASTER, 1996).

4.5.6 Análise do potencial transmembrânico mitocondrial

O ensaio de análise da despolarização mitocondrial, descrito por Rahn, Bombick e Doolittle (1991) foi realizado após 24 h de tratamento das células (15 x 10⁴/poço/ 24 poços) com o beta-nitroestireno 7E (1, 3 e 10 μg/mL), DMSO (10 μL/mL) e ETO (4 μg/mL). As células tratadas foram suspensas em 200 μL de solução de JC-1 (5 μg/mL em salina a 0,9%) e incubadas a 37°C na ausência de luz por 15 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspenso em salina 0,9% e incubado novamente por 30 minutos no escuro a 37°C. Logo em seguida, a emissão de fluorescência foi detectada por citometria de fluxo. A média geométrica obtida dos

histogramas foi utilizada para comparar as amostras e o programa utilizado para análise foi o Flowjo v.10.

4.5.7 Expressão proteica

Um volume de 5 mL de suspensão de células SK-MEL-3 (7×10^4 / mL) foi cultivada em garrafas por 24h e, posteriormente, tratadas por 1,3,6 ou 24 horas com 1, 3 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de 7E. O controle negativo foi tratado com DMSO (2%) e o controle positivo com doxorrubicina (2 $\mu\text{g/mL}$).

Após esse período, as células foram lisadas utilizando o tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, nonidet P-40 a 1%, desoxicolato de sódio a 0,5% e SDS a 0,1%) na presença de mistura de inibidores de protease. As quantidades de proteína foram quantificadas com o reagente de ensaio Bradford de Bio-Rad (Bio-Rad). Os extratos de proteína (50 μg) foram separados por eletroforese num gel desnaturante de poliacrilamida-SDS de 10-12% e electrotransferidos para membranas de nitrocelulose.

As membranas foram bloqueadas durante 1 h com PBS contendo leite seco desnatado a 5% (p/v) e tween 20 a 0,1%, lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 0,1% e depois incubadas com anticorpos primários específicos p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), p-p38 (Thr180/Tyr182), p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), caspase clivada 3 (Asp175), caspase clivada 9 (ASP 315) e anti- β -actina (8H10D10) (Cell Signalling Technology) diluídos 1:1000 em PBS contendo 5% (p/v) de BSA e 0,1% de tween 20. Após lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário

conjugado com HRP apropriado (Cell Signalling Technology) (1:3000). As bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando o sistema de detecção ECL, tal como descrito pelo fabricante (GE Healthcare).

4.6 Análise da expressão gênica

Um volume de 5 mL de suspensão de células SK-MEL-3 (7×10^4 / mL) foi cultivada em garrafas por 24h e, posteriormente, tratadas por 12 horas com 3 µg/mL de 7E. O controle negativo foi tratado com DMSO (2%) e o controle positivo com doxorubicina (2 µg/mL).

Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental. Um *pool* de cDNA obtido de três experimentos independentes foi utilizado para a análise. Todos os procedimentos foram realizados em condições DNase/RNase free.

4.6.1 Isolamento do RNA e transcrição reversa

Para o procedimento de extração de RNA, foram utilizadas microcolunas de sílica- Rneasy Plus Mini Kit (QIAGEN).

Após o tratamento, as células foram coletadas e lavadas três vezes com PBS gelado e uma vez com PBS/Tripsina 1%, para garantir que não ficassem agregadas. A tripsina foi inativada pela adição de meio de cultura contendo soro fetal bovino e as células foram transferidas para um microtubo e centrifugadas a $300 \times g$, durante 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e, em seguida, 350 µL do tampão de lise RLT

foi transferido para o *pellet* e a amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto. Em seguida, foi realizado *up and down* do lisado 10 vezes em agulha de 0,9 mm acoplada a seringa de 1 mL. O lisado foi então transferido para a microcoluna contendo Dnase, a fim de eliminar o DNA genômico. Em seguida, foi adicionado 350µL de etanol 70% na amostra, homogeneizando-se or *up and down* com pipeta. Após a passagem por nova microcoluna de sílica e lavagens com tampões do kit (RW1 e RPE), o RNA foi eluído com 50 µL de água Rnase/Dnase Free pH 7,4 e armazenado em temperatura de -80°C.

A quantidade e pureza do RNA extraído de cada amostra foi analisada em aparelho de fluorimetria (QuBit™, Life Technologies, USA) e a integridade das amostras testada em condições desnaturantes, em gel de agarose 1%, contendo Syber Safe (0,5mg/mL) e formaldeído 37%. A transcrição reversa foi realizada com a enzima transcriptase Superscript VILO™ (Invitrogen Corporation, USA) e as amostras de cDNA armazenadas em temperatura de -20°C.

4.6.2 PCR Array

Para as reações de PCR quantitativo em tempo real foram utilizados *TaqMan Gene Expression Assays™* (Life Technologies®) inventoriados para *TaqMan Array Human Molecular Mechanisms of Cancer 96 plate* (ID 4418806, Applied Biosystems™). As reações foram conduzidas no aparelho ABI ViiA7 (Applied Biosystems™). O programa de amplificação consistiu de um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As quantidades relativas (RQs) da expressão de RNA mensageiro

foram calculadas pelo método $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) através do Software Gene Expression Suite (Applied Biosystems™).

4.7 Avaliação da toxicidade *in vivo*

4.7.1 Animais

Para os ensaios de toxicidade aguda e eficácia antitumoral, serão utilizados, camundongos C57BL/6 machos e fêmeas com dois 2 meses de idade e com peso variando entre 25 a 30 g provenientes do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ – Salvador/BA). Os animais receberão água e dieta *ad libitum* e serão mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (25 ± 2 °C).

4.7.2 Modelo de melanoma murino *in vivo*

Foram realizadas duas tentativas de teste *in vivo* em modelo de melanoma humano utilizando a linhagem SK-MEL-3 em camundongos scid, no entanto o longo tempo necessário para crescimento tumoral e o pequeno volume dos tumores obtidos inviabilizaram o modelo. Sendo assim, optamos pelo modelo de melanoma murino para avaliar a atividade antitumoral de 7E. Para tanto, células B16-F10 (5×10^5

células/ 0,2 mL) em fase de crescimento *in vitro* exponencial foram injetadas pela via subcutânea no dorso dos animais. Um dia após a inoculação das células, os animais foram divididos em cinco grupos de 10 animais: não tratado (que receberam o veículo de injeção - solução de 30 µL de Kollifor, 30 µl de DMSO e 940 µL de salina), controle positivo (que foram tratados com doxorubicina 0,5 mg/kg), 7E 3 mg/kg, 7E 10 mg/kg e 7E 30 mg/kg. Os grupos receberam seus respectivos tratamentos intraperitonealmente por 13 dias consecutivos. Após o tratamento, todos os animais foram eutanasiados sob anestesia (10 mg/kg de xilazina e 90 mg/kg de quetamina). Os tumores foram retirados pesados e fixados em formol a 10%.

4.7.3 Toxicidade sistêmica

Os efeitos toxicológicos sistêmicos foram investigados conforme descrito previamente por Costa *et al.* (2015). Os camundongos foram pesados no início e no final do experimento. Os animais foram observados quanto a sinais de anormalidades ao longo do estudo. Fígados, rins, pulmões e corações foram removidos, pesados e examinados para detectar quaisquer sinais de lesões graves ou alterações de cor e hemorragia. As análises bioquímicas de amostras de soro foram realizadas utilizando um rotor Vet-16 e quantificadas utilizando um sistema analítico automatizado de química seca (Hemagen Diagnostics Inc. Veterinary Diagnostics). As análises hematológicas foram realizadas por microscopia óptica. Após exame macroscópico, tumores, fígados, rins, pulmões e corações foram fixados em tampão de formalina a

4% e incorporados em parafina. As secções dos tecidos foram coradas com hematoxilina e eosina, e um patologista realizou a análise sob microscopia óptica.

4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados em software graphpad prism 5 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, EUA). A estatística foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA *1 way* ou *2 way*, conforme o tipo de dado) seguida pelos testes de Newman-Keuls ou Bonferroni e apresentados como a média \pm erro padrão. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$. Os dados de CI50 foram obtidos por regressão não linear (sigmoidal) e apresentados como média e erro com base em seus intervalos de confiança de 95% (CI 95%).

5 RESULTADOS

A triagem de cerca de 150 substâncias naturais e sintéticas realizada de maio de 2013 a fevereiro de 2015 revelou algumas moléculas ativas de interesse para o grupo. Entre elas, o β -nitroestireno 7E se destacou por ter apresentado bom perfil citotóxico sobre células tumorais, ainda não relatado na literatura, e por ser um composto sintético passível de proteção patentária.

5.17E induz citotoxicidade em células de melanoma Humano

Ao compararmos os resultados de CI_{50} pelo teste de Alamar Blue® do composto 7E com os da doxorrubicina observamos que a citotoxicidade de 7E foi maior que do antineoplásico padrão nas linhagens SK-MEL-3 (melanoma humano) e MES-SA (sarcoma uterino humano), mas quais a doxorrubicina teve CI_{50} de 4,72 e 3,91 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Gráfico 1).

Do ponto de vista clínico, a baixa citotoxicidade de drogas sobre a linhagem normal (MRC5) é importante, pois quanto maior a seletividade da droga por células neoplásicas, mais brandos são os efeitos adversos decorrentes da terapia. Observamos que a citotoxicidade do composto 7E é menor em MRC5 do que em SK-MEL-3, MES-SA e B16F10 (tabela 2).

Haja visto os resultados iniciais promissores e considerando-se o mau prognóstico do câncer de pele tipo melanoma, o aumento da incidência desse tipo de câncer nos últimos 30 anos, bem como a efetividade limitada das terapias hoje

disponíveis no mercado e o interesse do laboratório nesse tipo de tumor, decidimos dar seguimento ao estudo da substância 7E utilizando a linhagem SK-MEL-3 (INCA, 2014; PALMIERI *et al.*, 2015; SKIN CANCER FOUNDATION, 2015).

Ao avaliar as características moleculares das três linhagens de melanoma humano avaliadas (SK-MEL-3, 28 e 103) percebeu-se que o fenótipo que inclui p53 selvagem, B-RAF mutado e N-RAS selvagem, referente à SK-MEL-3, foi mais sensível ao composto que os demais fenótipos apresentados anteriormente na tabela 1. A menor sensibilidade da linhagem SK-MEL-28 ao composto sugere que mutações em p53 possam comprometer levemente o mecanismo citotóxico da mesma. Aparentemente a mutação em N-RAS (SK-MEL-103) confere uma resistência ainda mais exacerbada à atuação do β -nitroestireno estudado.

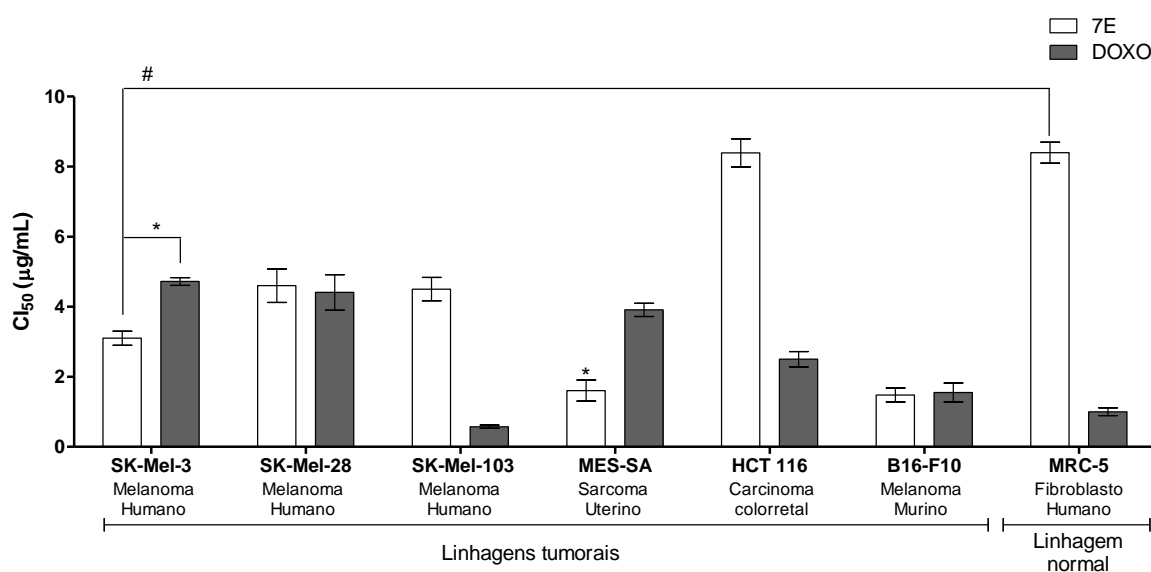


Gráfico 1: Comparação entre os valores de CI₅₀ obtidos de 7E e doxorrubicina em linhagens tumorais (MRC5, SK-MEL-3, SK-MEL-28, SK-MEL-103, MES-SA, HCT-116 e B16F10) e normais (MRC5).

FlownJo v.10. Resultados expressos em média \pm erro. *Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados de IC₅₀ de 7E *versus* IC₅₀ de doxorrubicina. # Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados linhagens neoplásicas *versus* linhagem normal.

Tabela 2: Concentração Inibitória 50 do β -nitroestireno 7E sobre as linhagens celulares MRC5, SK-MEL-3, SK-MEL-28, SK-MEL-103, MES-SA, HCT-116 e B16F10.

	Tipo celular	24h	48h	72h
MRC5	Fibroblasto normal	5,142 (4,417 - 5,985)	6,685 (6,151 - 7,266)	8,397 (7,608 - 9,267)
	SK-MEL-3 Melanoma Humano	4,631 (4,199 - 5,107)	4,277 (3,691 - 4,958)*	3,130 (1,922 - 5,097)*
SK-MEL-28	Melanoma Humano	10,81 (7,639 - 15,29)	3,786 (2,247 - 6,381)	4,640 (2,976 - 7,235)
	SK-MEL-103 Melanoma Humano	12,58 (9,728 - 16,26)	> 20 ug	4,504 (3,7 - 5,482)
MES-AS	Sarcoma Uterino	4,095 (1,271 - 13,19)	6,651 (5,555 - 7,965)	1,603 (1,437 - 2,262)*
	HCT-116 Carcinoma Colorretal	4,786 (4,051 - 5,653)	2,712 (1,788 - 4,112)	8,389 (7,273 - 9,697)
B16F10	Melanoma Murino	15,12 (11,69 - 19,55)	5,626 (4,064 - 7,787)	1,480 (1,340 - 1,636)*

Resultados expressos em $\mu\text{g/mL} \pm$ erro. *Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados de linhagens neoplásicas *versus* linhagem normal.

Por meio do teste do alamar blue não é possível distinguir com clareza a inibição de proliferação da morte celular propriamente dita. Portanto, realizamos a confirmação da atividade citotóxica através do teste de viabilidade pelo azul de tripiano. Foi confirmada a ocorrência de redução significativa da viabilidade (gráfico 2) e aumento proporcional de morte (gráfico 3) provocada pelo tratamento com 7E por 12, 24 e 48 horas nas concentrações de 1, 3 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$, comparando-se ao controle (tratado com DMSO).

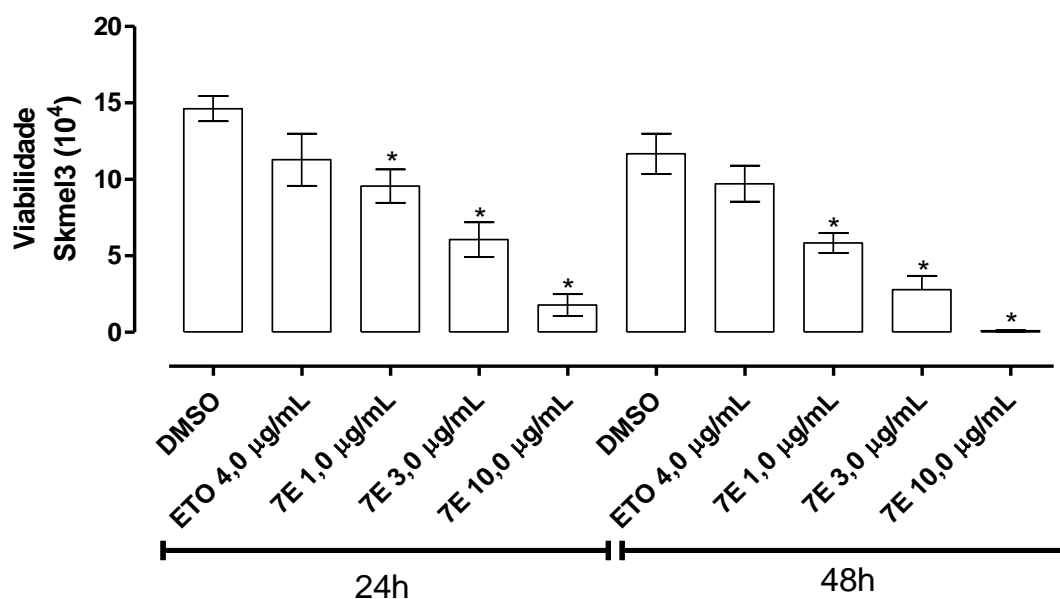


Gráfico 2: Efeito de 7E nas concentrações de 1, 3 e 10,0 µg/mL sobre a viabilidade da linhagem SK-MEL-3 após 24 e 48h de tratamento pelo método do azul de tripano. Etoposídeo (ETO) 4 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

FlownJo v.10. Resultados expressos em média ± erro. *Representa valores de P<0,05 após análise por 1way ANOVA seguida de pós teste de Newman-Keuls de dados de tratamento versus controle negativo (DMSO).

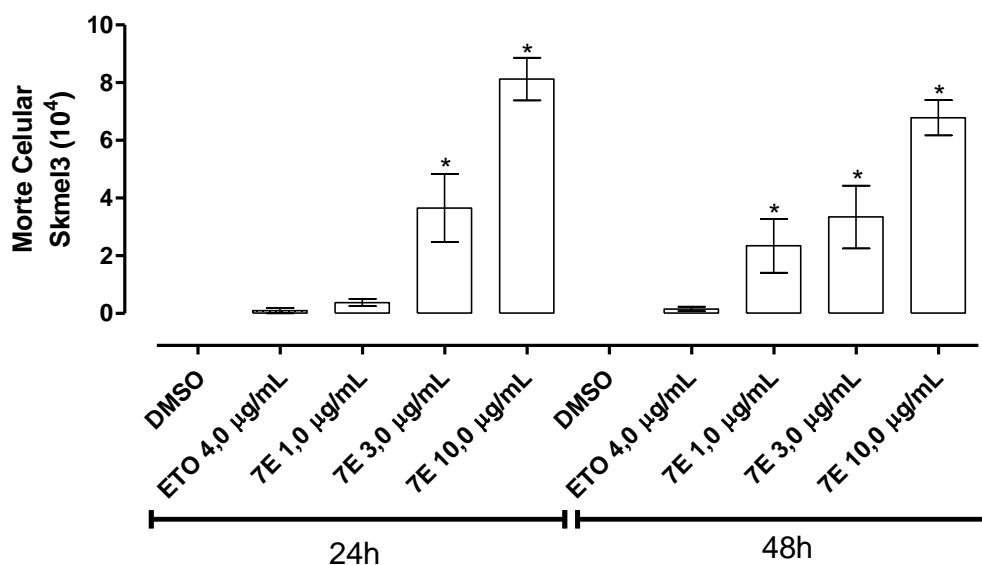


Gráfico 3: Efeito de 7E nas concentrações de 1, 3 e 10,0 µg/mL sobre a morte da linhagem SK-MEL-3 após 24 e 48h de tratamento pelo método do azul de tripano. Etoposídeo (ETO) 4,0 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

FlownJo v.10. Resultados expressos em média ± erro. *Representa valores de P<0,05 após análise por 1way ANOVA seguida de pós teste de Newman-Keuls de dados de tratamento versus controle negativo (DMSO).

Adicionalmente, realizamos citometria com marcação por PI das células tratadas com o composto 7E por 24 e 48h. Em 24h de tratamento, na menor concentração da droga (1,0 µg/mL) já é possível observar aumento significativo de células marcadas em sub G1 (16,8%), que atinge níveis máximos após 48 horas de tratamento com 3,0 µg/mL da droga (80,1%) (tabela 3). Além de confirmarmos a intensa fragmentação do DNA induzida pelo tratamento com 7E, o ensaio de ciclo celular permitiu constatar a parada na fase G2/M induzida pelo antineoplásico padrão Etoposídeo (gráfico 4).

Tabela 3: Frequência de células nas fases sub G1, G₀/G₁, S e G₂/M do ciclo celular após 24 e 48 horas de tratamento com 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL). Etoposídeo (ETO) 4 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

	Droga	Concentração (µg/mL)	Fase do ciclo celular (%)			
			Sub G1	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24 horas	DMSO	0,2%	2,1 ±2,4	36,2 ±9,2	24,5 ±6,2	37,2 ±5,5
	ETO	2,0	7,1 ±5,2	16,6 ±5,6	8,0 ±2,9	68,3 ±4,1*
	7E	1,0	16,8 ±6,6*	45,4 ±14,9	6,6 ±11,1	31,2 ±5,7
	7E	3,0	41,9 ±7,0*	30,4 ±17,6	10,6 ±6,6	21,6 ±4,5
	7E	10,0	57,4 ±10*	20,6 ±11,4	7,2 ±3,8	14,8 ±2,0
48 horas	DMSO	0,2%	2,7 ±7,2	39,7 ±6,9	23,7 ±2,3	34,5 ±5,1
	ETO	2,0	12,2 ±6,7*	15,6 ±4,5	3,5 ±9,3	77,0 ±2,8*
	7E	1,0	44,5 ±12*	27,5 ±10,1	16,3 ±5,4	11,9 ±5,4
	7E	3,0	80,1 ±8,0*	4,5 ±5,9	3,2 ±2,5	13,0 ±3,6
	7E	10,0	43,3 ±12*	28,4 ±10,4	14,8 ±3,2	13,2 ±3,2

Resultados expressos em média ± erro. *Representa valores de P<0,05 após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

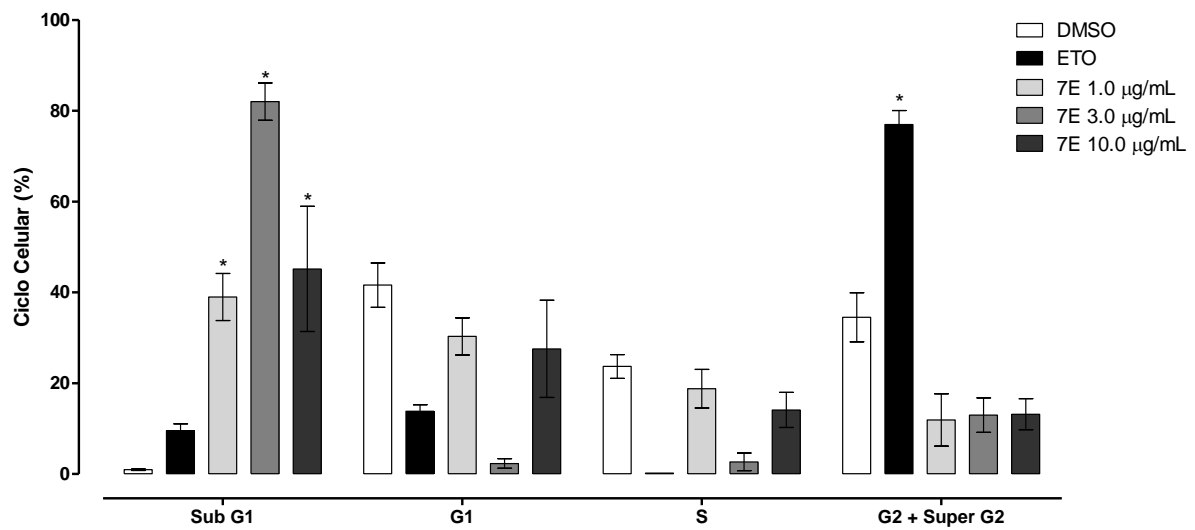


Gráfico 4: Efeito de 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) sobre o ciclo celular da linhagem SK-MEL-3 após 24 e 48h de tratamento por citometria de fluxo com marcação com PI. Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média ± erro. *Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

A morte celular pode ocorrer por mecanismos diversos, sendo a apoptose, necrose e autofagia alguns tipos de morte celular mais acessados isoladamente ou em conjunto no tratamento antineoplásico. Quando elas ocorrem é possível identificar, por microscopia óptica, algumas alterações morfológicas qualitativas típicas como picnose, vacuolização, aumento do volume celular, alterações membranares, presença de núcleos desnudos e cariorréx (destacadas na figura 9). Sendo assim, com intuito de fazer observações iniciais sobre quais mecanismos de morte poderiam estar sendo ativados foi realizada a observação microscópica das células SK-MEL-3 tratadas com DMSO, doxorrubicina, etoposídeo e 7E, onde pudemos observar a ocorrência de picnose e vacuolização, sobretudo após 48 de tratamento com o β -nitroestireno 7E, em todas as concentrações testadas (figura 13).

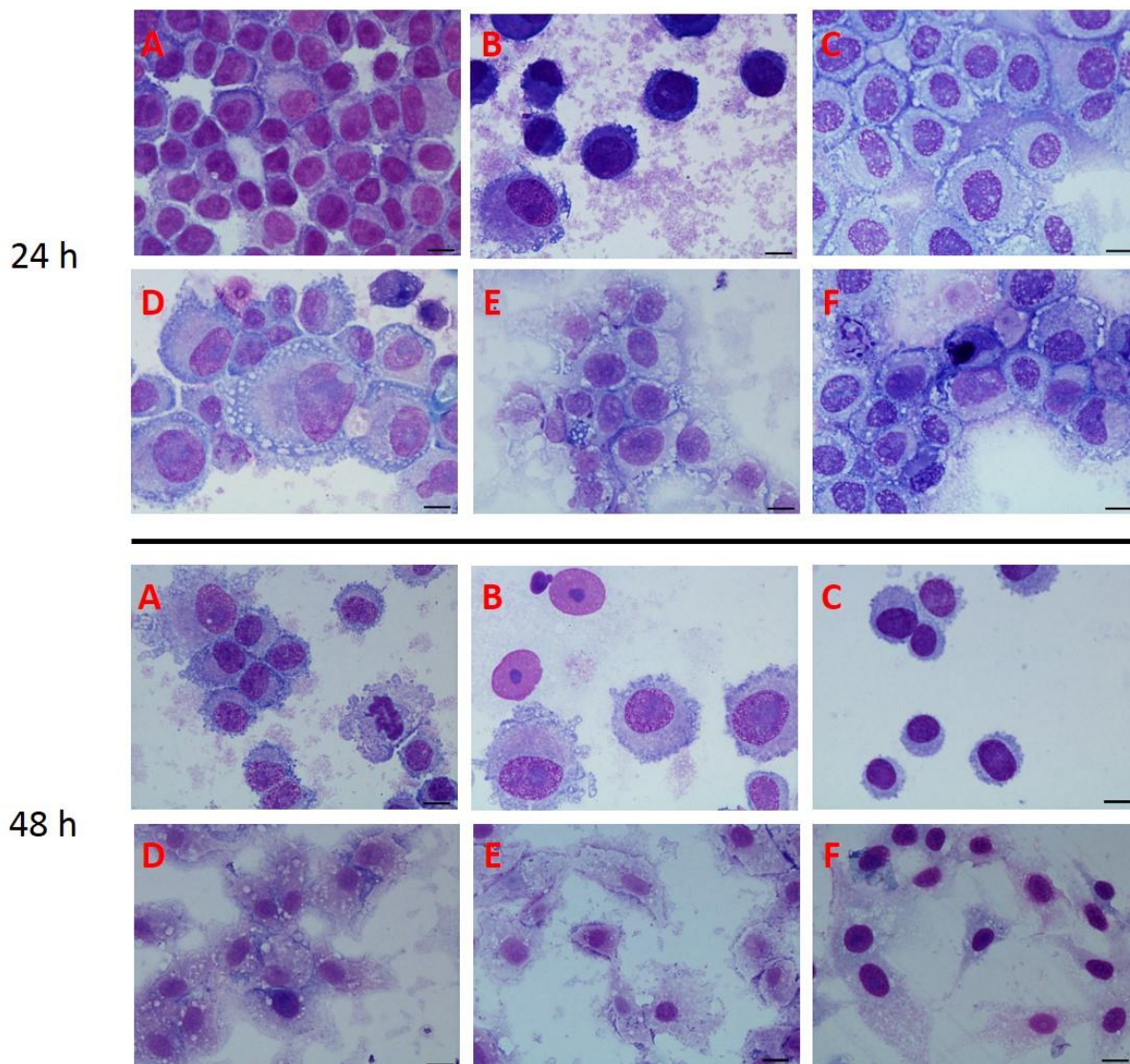


Figura 13: Alterações morfológicas e de coloração provocadas pelos tratamentos de 24 e 48h com DMSO 10 $\mu\text{L/mL}$ (A), Doxorubicina 4 $\mu\text{g/mL}$ (B), Etoposídeo 4 $\mu\text{g/mL}$ (C), β -nitrostireno 7E 1 (D), 3 (E) e 10 (F) $\mu\text{g/mL}$ em células da linhagem SK-MEL-3 coradas com panótico rápido (aumento 400x).

Após 48 horas é possível visualizar picnose nas células tratadas do 7E (D, E, F), além de vacuolização citoplasmática (marcante em D) e alteração da morfologia celular (A, B e C apresentam-se arredondadas; D, E e F apresentam-se fusiformes)

As observações feitas durante a análise morfotintorial levantaram a suspeita de ocorrência de apoptose decorrente do tratamento com 7E, cuja frequência foi avaliada na análise da marcação da externalização da fosfatidilserina pela anexina V por citometria de fluxo (figura 14). Conforme exposto no gráfico 5, a apoptose parece ser o mecanismo responsável pela morte de até 80% dos melanócitos malignos após 24 horas de tratamento.

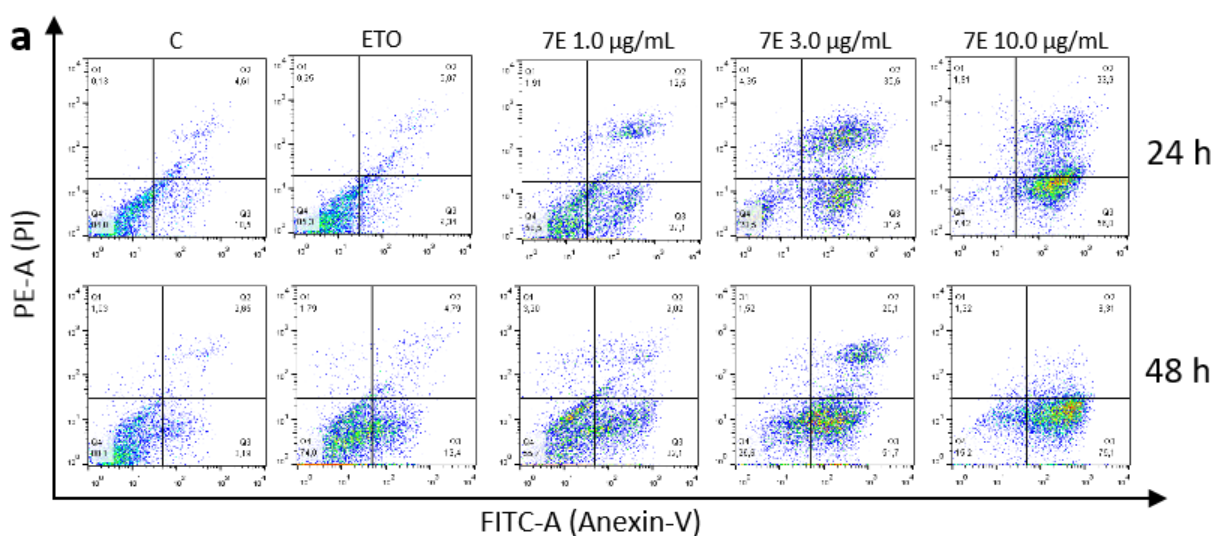


Figura 14: Gráfico representativo da análise citométrica de marcação com anexina V/PI de células da linhagem SK-MEL-3 tratadas por 24h e 48h com β -nitroestireno 7E nas concentrações de 1,0; 3,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Etoposídeo (ETO) 2 $\mu\text{g/mL}$ foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

FlownJo v.10. Os gráficos apresentam os percentuais de marcação por anexina (Q3), anexina + PI (Q2) e PI (Q1), que sugerem a ocorrência dos eventos de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose, respectivamente. Etoposídeo (ETO) 4 $\mu\text{g/mL}$ foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

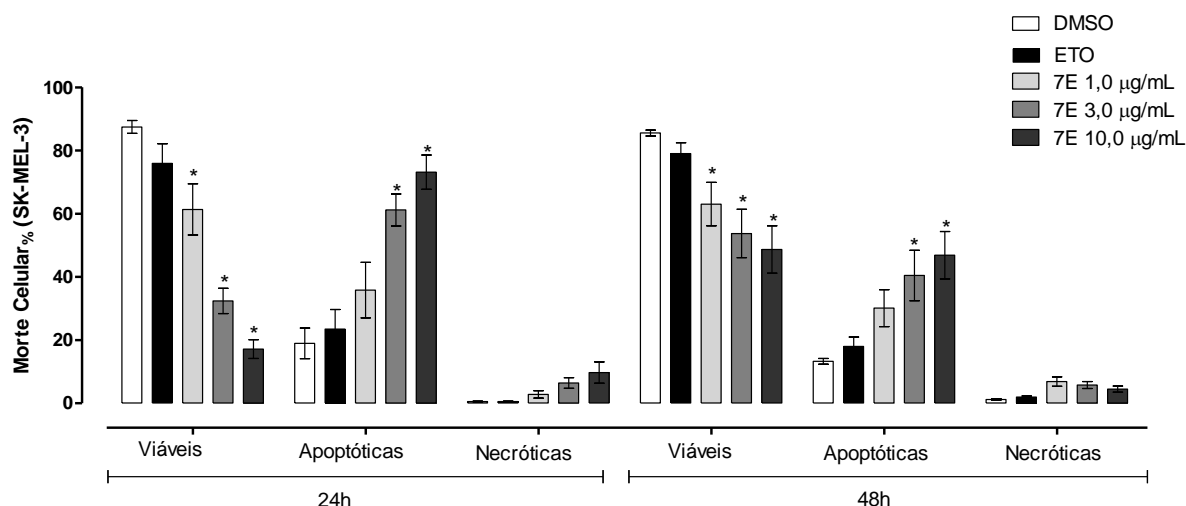


Gráfico 5: Percentual de viabilidade e morte celular por apoptose e necrose (anexina V/PI) de células da linhagem SK-MEL-3 tratadas com 7E (24 e 48h/ 1,0; 3,0 e 10,0 µg/mL). Etoposídeo (ETO) 4 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média \pm erro. *Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

1.1 Envolvimento de EROs e ERNs na citotoxicidade de 7E

A produção exacerbada ou a falha no processo de redução resulta no acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs) intracelular, o que pode causar danos, sendo até mesmo potencialmente letal à célula. Alguns quimioterápicos usualmente aumentam os níveis de EROs como parte de seu mecanismo de ação citotóxica. Como mostrado no gráfico 6, após 3 horas do tratamento com 7E houve aumento significativo de EROs nas células SK-MEL-3. Entre as espécies reativas que podem estar contribuindo para esse aumento, constatamos a participação de superóxido (gráfico 7) e nitrito (gráfico 8).

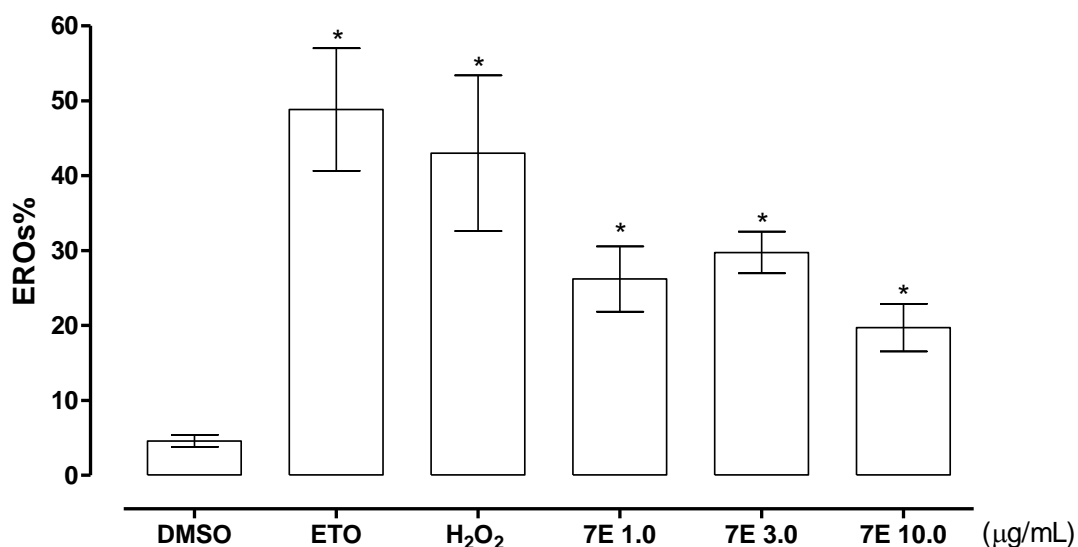


Gráfico 6: Efeito de 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) sobre a produção de EROs da linhagem SK-MEL-3 após 3h de tratamento. Análise por citometria de fluxo (DCFDA). Etoposídeo (ETO) 4 µg/mL e H₂O₂ foram usados como controles positivos. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média ± erro. *Representa valores de P<0,05 após análise por ANOVA 1 way seguido de teste de Newman-Keuls de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

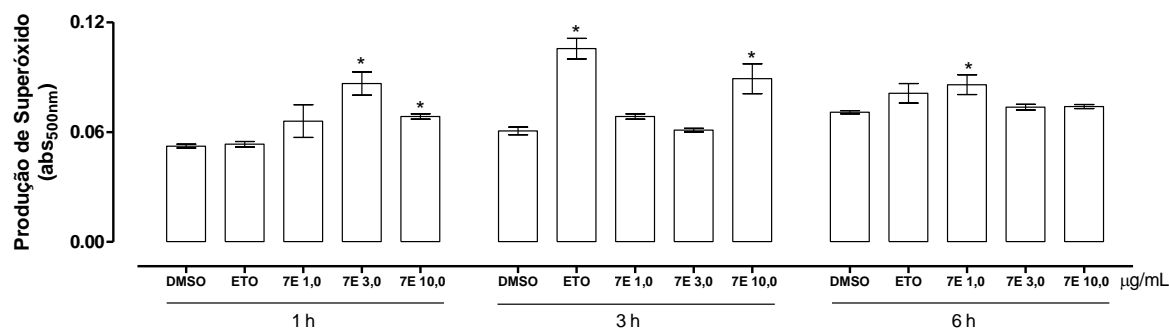


Gráfico 7: Efeito de 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) sobre a produção de superóxido pela linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Etoposídeo (ETO) 4 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média ± erro. *Representa valores de P<0,05 após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

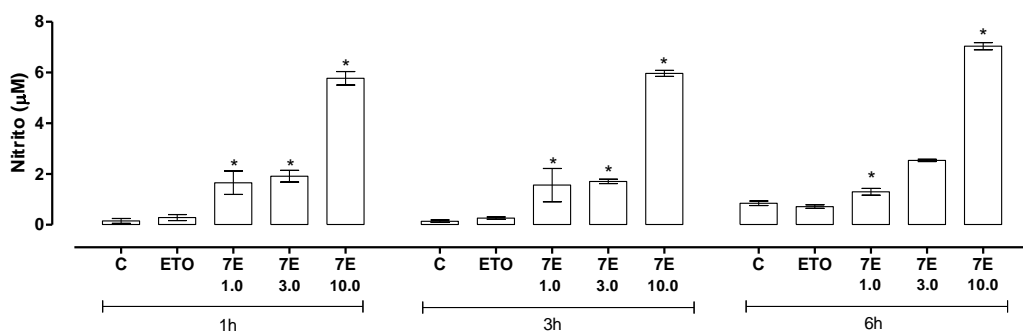


Gráfico 8: Efeito de 7E nas concentrações de 1, 3 e 10,0 µg/mL sobre a produção de nitrito pela linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média ± erro. *Representa valores de P<0,05 após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

No sentido de verificarmos se a produção de EROs é essencial para a morte celular induzida por 7E, nós realizamos o ensaio de viabilidade pelo azul tripano utilizando pré-tratamento com antioxidante tiol N-acetil-L-cisteína (NAC). Observou-se que o estresse oxidativo provocado por 7E é indispensável para a promoção da morte celular, pois quando as células são pré-tratadas com NAC não ocorre morte celular em 24 nem em 48 horas decorridas do tratamento com 7E (gráfico 9).

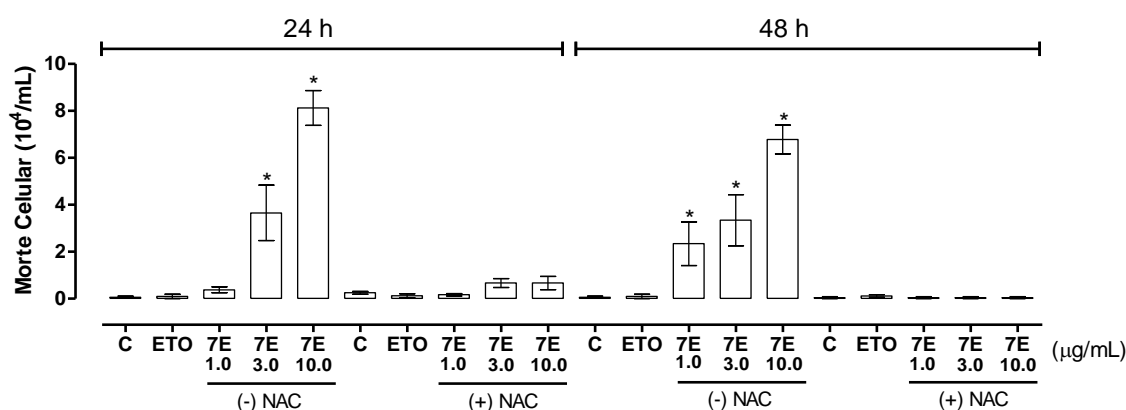


Gráfico 9: Efeito de 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) sobre a morte de células linhagem SK-MEL-3 após 24 e 48 h de tratamento com e sem pré-tratamento com NAC. Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média ± erro. *Representa valores de P<0,05 após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

5.2 Vias de morte celular afetadas pelo tratamento com 7E

Sabe-se que o aumento de EROs/ ERNs intracelular é capaz de deflagrar diferentes mecanismos de morte celular, entre elas, a apoptose pela via intrínseca dependente de caspase. Por essa via ocorre alteração do potencial de membrana mitocondrial, permeabilização da mitocôndria, liberação de proteínas do espaço intermembranar mitocondrial, formação do apoptossomo, ativação da caspases 9 e da caspase efetora 3, que, entre outros efeitos, induz fragmentação do DNA, já mostrada anteriormente durante o ensaio de ciclo celular.

Conforme mostrado na figura 15 e gráfico 10, o tratamento com 7E provoca alteração do potencial de membrana, já com 3 horas de exposição na concentração de 10,0 µg/mL e com 24 horas de exposição nas três concentrações testadas (1, 3 e 10 µg/mL).

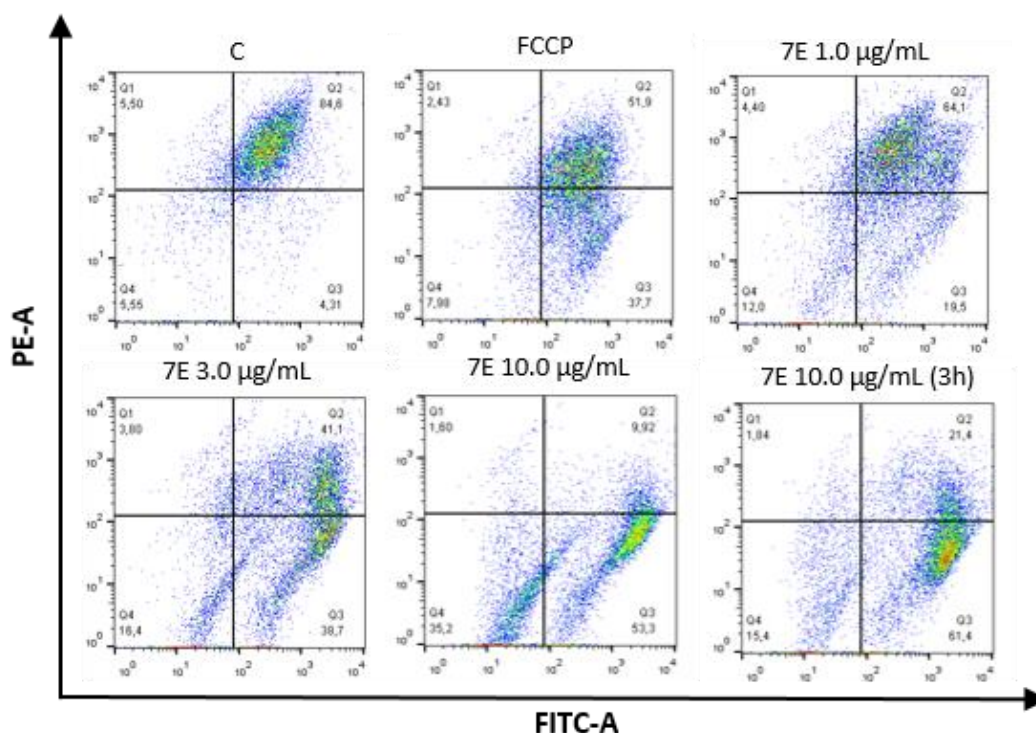


Figura 15: Gráfico representativo da análise citométrica de marcação com JC-1 de células da linhagem SK-MEL-3 tratadas por 24h com 7E (1, 3 e 10,0 µg/mL) e por 3h (10,0 µg/mL). Etoposídeo (ETO) 2 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

FlowJo v.10. Os gráficos apresentam os percentuais de marcação por JC1 em filtro vermelho (Q2) e verde (Q3), que sugerem a ocorrência de mitocôndrias em seu estado normal polarizadas (Q2) e despolarizadas (Q3).

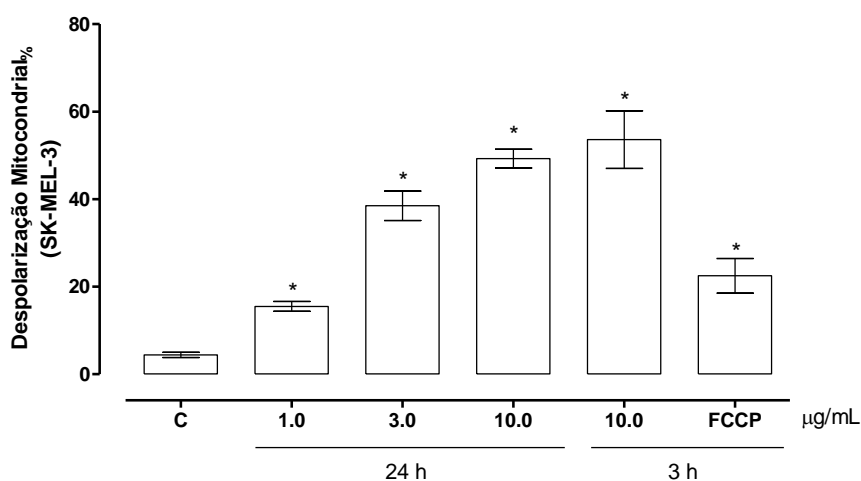


Gráfico 10: Efeito de 7E (1, 3 e 10 µg/mL) sobre a despolarização mitocondrial da linhagem SK-MEL-3 após 24 e 3h de tratamento. FCCP 100 µg/mL foi usado como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média ± erro. *Representa valores de P<0,05 após análise por 2way ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni de dados de tratamento versus controle negativo (DMSO).

Corroborando para a confirmação da participação da via intrínseca na citotoxicidade de 7E, demonstramos que, após 24h de tratamento, o composto induz ao aumento dos níveis intracelulares de caspase 9 e 3 clivadas, sobretudo na concentração de 3,0 $\mu\text{g/mL}$. Provavelmente, a clivagem das caspases induzida pelo tratamento de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ ocorre mais precocemente, sendo assim, ao final de 24 horas de tratamento, a morte celular já ocorreu e as enzimas já foram consumidas no processo. Por esse motivo já não se observa caspase 9 clivada no resultado e observa-se apenas uma quantidade reduzida de caspase 3 clivada.

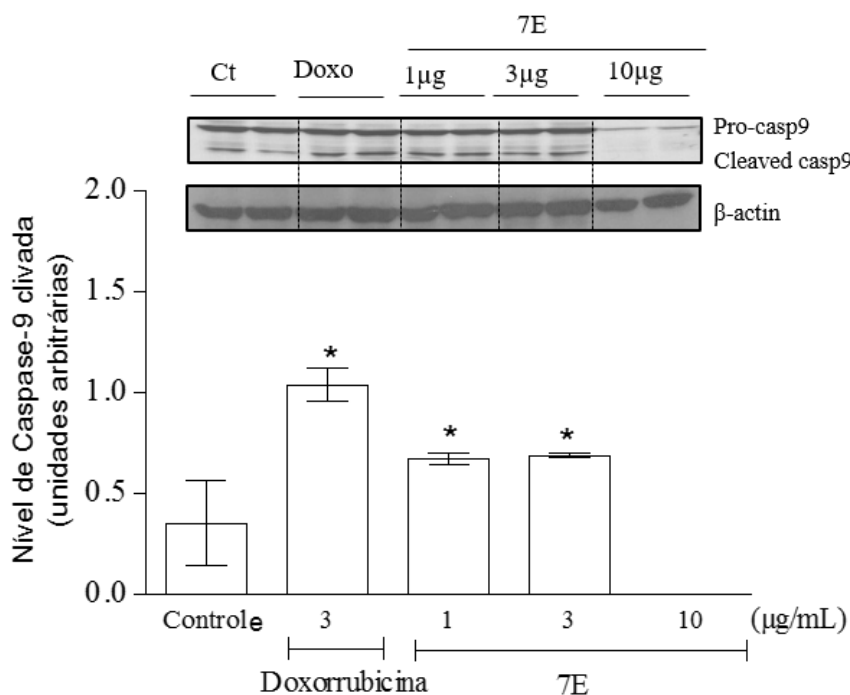


Gráfico 11: Efeito de 7E (1, 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$) sobre a expressão da enzima caspase 9 clivada na linhagem SK-MEL-3 após 24h de tratamento. Doxorrubicina 2 $\mu\text{g/mL}$ foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média/mg de proteína \pm erro. *Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 1 way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

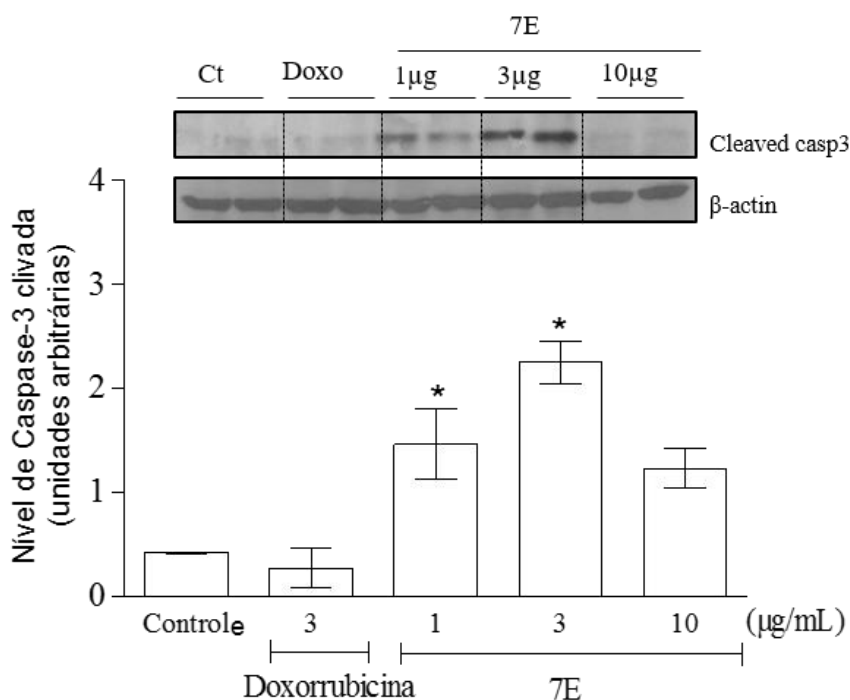


Gráfico 12: Efeito de 7E (1, 3 e 10 µg/mL) sobre a expressão da enzima caspase 3 clivada na linhagem SK-MEL-3 após 24h de tratamento. Doxorrubicina 2 µg/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média/mg de proteína ± erro. *Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 1 way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

Um regulador importante da via intrínseca da apoptose é a proteína antiapoptótica BCL-2, que, inibe a formação de poros de BAK e BAX na membrana externa da mitocôndria, prevenindo a apoptose. Uma das estratégias quimioterápicas envolve a inibição ou a redução da expressão de BCL-2. Conforme mostrado no gráfico 13, o tratamento das células SK-Mel com o composto 7E por 1, 3 e 6 horas foi capaz de induzir redução significativa na expressão de BCL-2 nas três concentrações testadas.

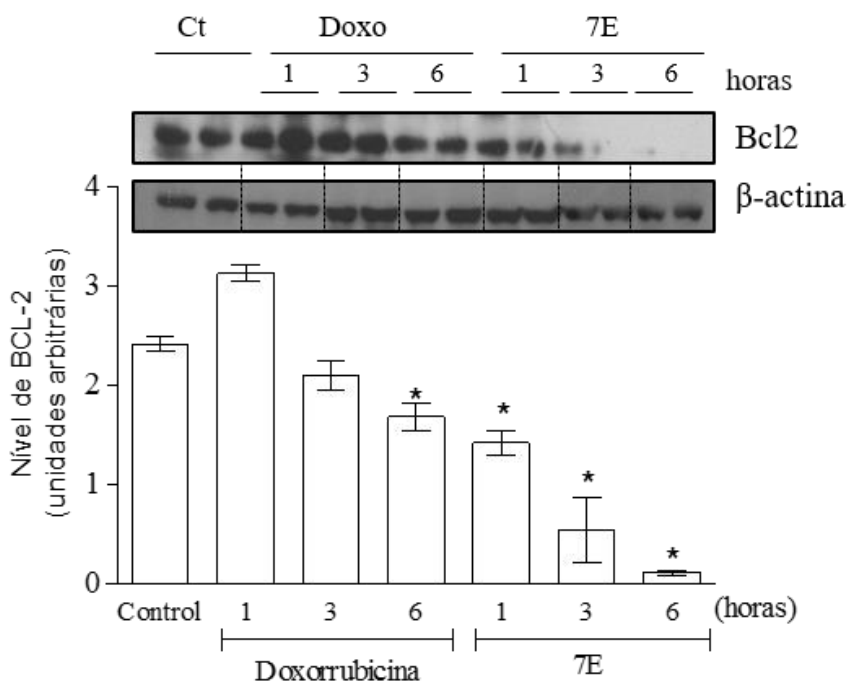


Gráfico 13: Efeito de 7E (1, 3 e 10 µg/mL) sobre a expressão de Bcl-2 na linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Doxorubicina 2 µg/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média/mg de proteína ± erro. *Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 1 way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

Outra proteína que tem papel de destaque na morte celular é a MAP quinase JNK. Algumas de suas ações importantes incluem a inibição de BCL-2, e a ativação de p38, cujos efeitos incluem a indução de parada de ciclo celular, de diferenciação celular, de senescência, de ativação da caspase 8 e dano ao DNA. Conforme mostrado nos gráficos 14 e 15, o tratamento com 7E induziu aumento da expressão de JNK e p38 fosforiladas.

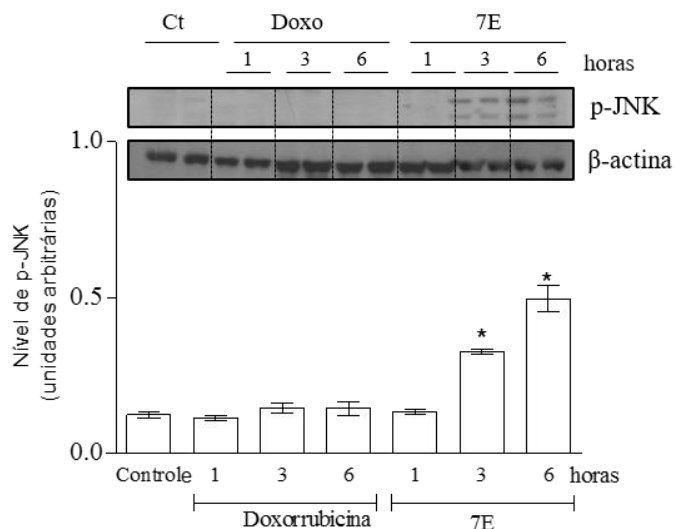


Gráfico 14: Efeito de 7E (1, 3 e 10 μ g/mL) sobre a expressão de p-JNK na linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Doxorubicina 2 μ g/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média/mg de proteína \pm erro. *Representa valores de P < 0,05 após análise por 1 way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

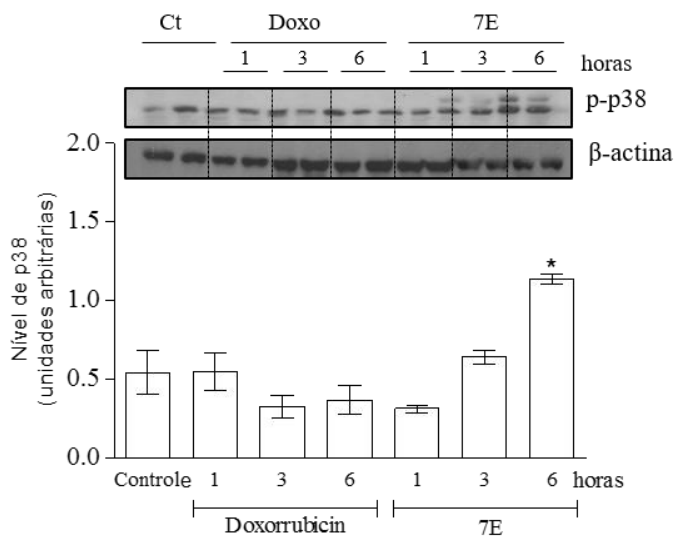


Gráfico 15: Efeito de 7E (1, 3 e 10 μ g/mL) sobre a expressão de p-38 na linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Doxorubicina 2 μ g/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média/mg de proteína \pm erro. *Representa valores de P < 0,05 após análise por 1 way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

A MAP quinase ERK pode ter efeitos celulares variados, que vão desde o estímulo da divisão e crescimento celular até a deflagração de morte. Os efeitos de ERK relacionados à morte celular estão ligados à alteração do potencial de membrana mitocondrial, que foi relacionada anteriormente ao tratamento com 7E, e à modulação da transcrição membros pró-apoptóticos da família de BCL-2. ERK pode ser diretamente ativada diretamente por estresse oxidativo. A morte celular mediada por ERK depende do prolongamento dessa ativação e da presença de EROs para acontecer (CAGNOL; CHAMBARD, 2010). Conforme mostrado no gráfico 16, o tratamento por 1, 3 e 6 horas com 7E é capaz de aumentar a expressão de ERK fosforilada (ativada).

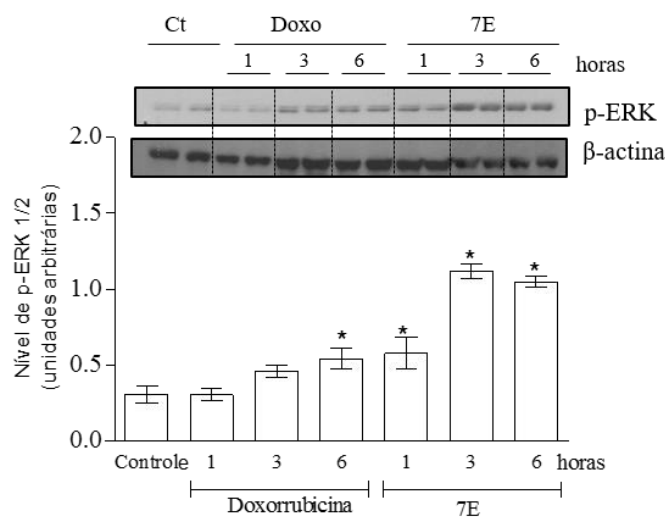


Gráfico 16: Efeito de 7E nas concentrações de 1, 3 e 10 µg/mL sobre a expressão de p-ERK 1/2 na linhagem SK-MEL-3 após 1, 3 e 6 h de tratamento. Doxorubicina 2 µg/mL foi usada como controle positivo. DMSO (0,1%) foi usado como controle negativo.

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média/mg de proteína ± erro. *Representa valores de $P < 0,05$ após análise por 1 way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

5.3 Influência do tratamento com 7E na expressão gênica de células de melanoma

A expressão de genes envolvidos na carcinogênese foi detectada usando o *TaqMan® Array Human Molecular Mechanisms of Cancer* após 12 h de tratamento com 7E (3 µg/mL). Os genes listados atuam em diversos aspectos do controle celular, como proliferação, diferenciação, ciclo celular, angiogênese, metástase e apoptose. Foram considerados regulados positivamente genes com valores de RQ $\geq 2,0$ e regulados negativamente aqueles com valores de RQ $\leq 1,0$, o que indica que a sua expressão era o dobro ou a metade da expressão apresentada pelas células do controle, respectivamente. Os genes 18S e HPRT1 foram utilizados para a normalização da expressão gênica. Os valores de RQ obtidos para as células tratadas com doxorubicina (4 µg/mL) e 7E (3 µg/mL) estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Efeito de 7E na concentrações de 3 µg/mL sobre a expressão de genes relacionados à carcinogênese em células SK-MEL-3 após 12 horas de tratamento.

Genes	Nomenclatura NCBI (<i>genBank</i>)	DMSO	DOXO	7E
GUSB	<i>glucuronidase, beta</i>	1,00	3,817	0,88
ABL1	<i>ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase</i>	1,00	0,596	0,835
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	1,00	1,153	1,088
AKT2	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i>	1,00	0,545	0,634
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>	1,00	0,477	1,979
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>	1,00	3,104	1,191
BCAR1	<i>breast cancer anti-estrogen resistance 1</i>	1,00	1,88	
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>			
BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>	1,00	0,437	0,707
BCL2L11	<i>BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)</i>	1,00	1,049	0,786
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	1,00	0,792	0,304
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>	1,00	0,375	0,693
CASP8	<i>caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>		0,334	0,690
CASP9	<i>caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase</i>			
CCND1	<i>Cyclin D1</i>	1,00	0,459	0,552
CCND2	<i>Cyclin D2</i>			
CCND3	<i>Cyclin D3</i>	1,00	0,883	0,454
CCNE1	<i>Cyclin E1</i>	1,00	0,470	0,423
CDC42	<i>Cell division cycle 42</i>	1,00	0,453	2,155
CDH1	<i>cadherin 1, type 1</i>			
CDK2	<i>cyclin-dependent kinase 2</i>	1,00	0,634	0,996
CDK4	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>	1,00	0,273	0,724
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>	1,00	4,030	0,940
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>	1,00	0,897	0,522
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2^a</i>			
CDKN2B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)</i>			
COL1A1	<i>collagen, type I, alpha 1</i>			
CRK	<i>v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog</i>	1,00	0,727	0,601
CTNNB1	<i>catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa</i>	1,00	0,611	0,344
CYCS	<i>cytochrome c, somatic</i>	1,00		
DVL1	<i>dishevelled segment polarity protein 1</i>	1,00	0,112	0,490
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>	1,00	0,190	0,596
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	1,00	1,779	1,496
ELK1	<i>ELK1, member of ETS oncogene family</i>	1,00	0,891	0,346
ERBB2	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>	1,00	2,750	0,953
FADD	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>	1,00	0,880	
FAS	<i>Fas cell surface death receptor</i>	1,00	242,40	11,410
FASLG	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>			
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2 (basic)</i>	1,00	2,370	1,495

FN1	<i>fibronectin 1</i>	1,00	0,535	2,564
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	1,00	1,664	7,832
FYN	<i>FYN proto-oncogene, Src family tyrosine kinase</i>	1,00	2,343	1,811
FZD1	<i>frizzled class receptor 1</i>	1,00	0,173	0,193
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>	1,00	0,461	0,571
GSK3B	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>	1,00	1,074	0,946
HGF	<i>hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)</i>			
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>			
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i>			
IGF1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>	1,00	1,808	3,761
ITGA2B	<i>integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)</i>			
ITGAV	<i>integrin, alpha V</i>	1,00	0,843	0,912
ITGB1	<i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>	1,00	2,639	2,914
ITGB3	<i>ITGB3 integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)</i>	1,00	0,764	0,875
JUN	<i>jun proto-oncogene</i>	1,00	0,433	0,678
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i>			
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>			
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	1,00	0,582	0,416
LEF1	<i>lymphoid enhancer-binding factor 1</i>	1,00	1,360	0,439
MAP2K1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>	1,00	0,622	0,406
MAP3K5	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5</i>	1,00	1,299	0,903
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>	1,00	0,469	0,327
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>	1,00	2,761	0,512
MAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>	1,00	0,820	0,742
MAPK8	<i>mitogen-activated protein kinase 8</i>	1,00	1,159	5,646
MAX	<i>MYC associated factor X</i>			
MDM2	<i>MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>	1,00	52,652	4,402
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	1,00	0,294	0,575
NFKB1	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>	1,00	0,721	0,798
NFKB2	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)</i>	1,00	1,952	1,885
NFKBIA	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>	1,00	0,203	0,353
NRAS	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>	1,00	0,512	0,764
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>	1,00	1,20	0,490
PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>	1,00	0,891	1,640
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>	1,00	0,998	1,262
PTK2	<i>protein tyrosine kinase 2</i>	1,00	0,323	0,445

PTK2B	<i>protein tyrosine kinase 2 beta</i>			
RAC1	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)</i>	1,00	0,462	0,718
RAF1	<i>Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>	1,00	0,535	0,475
RB1	<i>retinoblastoma 1</i>	1,00	1,583	1,198
RELA	<i>NF-kappa-B</i>	1,00	0,619	0,889
RHOA	<i>ras homolog family member A</i>	1,00	0,679	0,671
SHC1	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>	1,00	0,339	0,266
SMAD4	<i>SMAD family member 4</i>	1,00	0,469	0,552
SOS1	<i>son of sevenless homolog 1 (Drosophila)</i>	1,00	0,770	0,725
SPP1	<i>secreted phosphoprotein 1</i>	1,00	0,757	1,024
SRC	<i>SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</i>	1,00	2,543	1,377
TCF3	<i>transcription factor 3</i>	1,00	8,983	17,095
TGFB1	<i>transforming growth factor, beta 1</i>	1,00	0,679	0,641
TGFBR1	<i>transforming growth factor, beta receptor 1</i>	1,00	1,436	0,410
TGFBR2	<i>transforming growth factor, beta receptor II</i>	1,00	0,587	0,529
P53	<i>tumor protein p53</i>			
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>	1,00	1,604	0,734
WNT1	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 1</i>			

Os valores representam a quantificação relativa (RQ) e os resultados apresentados foram comparados com a expressão dos genes no grupo controle negativo (DMSO 0,2%), sendo considerada **superexpressão** valores de RQ>2, **subexpressão** valores de RQ<1 e **expressão equivalente** valores de RQ entre 0,51 – 1,999. Genes em que não apresentaram expressão estão com as colunas correspondentes aos resultados vazias. Os genes 18S e HPRT1 foram utilizados como gene endógeno para normalização.

5.47E inibe o crescimento tumoral *in vivo*

7E demonstrou efeito antitumoral sobre o crescimento do tumor num modelo de melanoma murino, no qual camundongos C57BL/6 foram inoculados por via subcutânea com células de melanoma murino B16F10 e, em seguida, tratados por via intraperitoneal durante 13 dias consecutivos.

A comprovação da atividade antitumoral *in vivo* do composto 7E se deu ao observarmos que a droga foi capaz de inibir efetivamente 43,3%, 47,8% e 47,2% do crescimento tumoral com os tratamentos de 3, 10 e 30 mg/kg, respectivamente, em comparação com o grupo controle não tratado. Em contrapartida, no tratamento com a droga padrão doxorrubicina 0,5 mg/kg houve redução de apenas 24% do crescimento tumoral (tabela 5 e gráfico 7). Adicionalmente, constatamos um bom perfil de segurança de uso, sobretudo na dose de 3 mg/kg de 7E, na qual nenhum animal do grupo morreu. É válido destacar que a dose de doxorrubicina utilizada foi muito menor que as doses de 7E, devido a elevada toxicidade sistêmica dessa droga, que limita seu uso em maiores doses.

Tabela 5: Efeito de 7E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg sobre o peso final da massa tumoral oriundas de camundongos inoculados com células B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Sobrevida	Tumor (g)	Inibição tumoral (%)
Não tratado	-	9/10	4,89±0,69	-
Doxorrubicina	0,5	9/10	3,72±0,93*	24,0
7E	3	10/10	2,77±0,88*	43,3
7E	10	9/10	2,56±0,58*	47,8
7E	30	8/10	2,58±0,94*	47,2

Os valores do tamanho tumoral correspondem a média ± erro. O grupo controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. *Representa valores de P<0,05 após análise por 1 way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

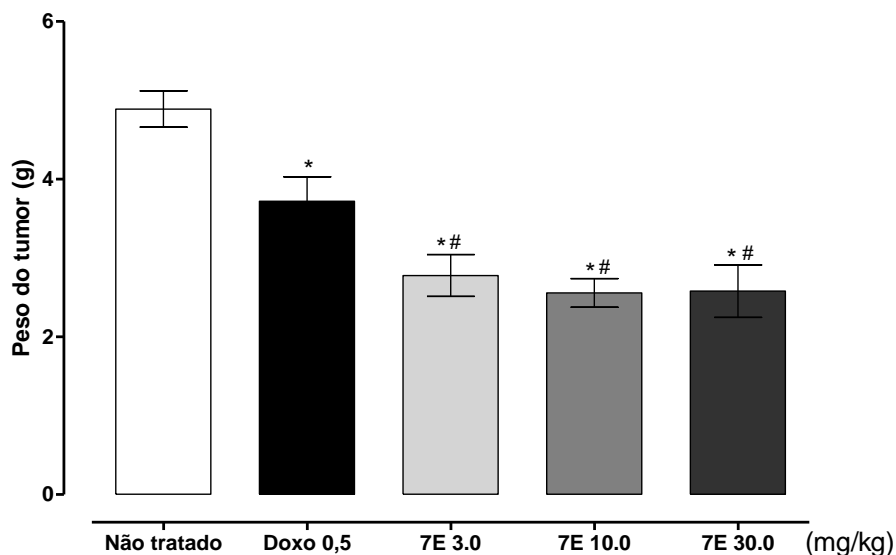


Gráfico 7: Efeito antitumoral do tratamento intraperitoneal com 7E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg de camundongos C57BL/6 inoculados com a linhagem B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação..

Graphpad Prism v.5. Resultados expressos em média ± erro. Doxorrubicina 0.5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. *Representa valores de P<0,05 após análise por 1 way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento *versus* controle negativo (DMSO).

O efeito tóxico sistêmico de 7E foi verificado após 13 dias de tratamento consecutivos. Os dados referentes à massa corporal e à massa úmida dos órgãos apontam a segurança do uso do composto 7E, pois não houve diferença significativa entre os resultados do grupo controle não tratado e dos grupos tratados (Tabela 6). O mesmo perfil de segurança se observa ao analisarmos os dados referentes às contagens globais de hemácias e leucócitos e dosagens bioquímicas. Nem mesmo a maior dose de 7E (30 mg/kg) foi capaz de provocar alterações hematológicas significativas, enquanto a doxorrubicina (0,5 mg/kg) induziu redução da contagem global de hemácias (tabela 7). Entre os parâmetros bioquímicos a única alteração observada foi referente às dosagens de BUN (uréia nitrogenada), o que pode ser explicado com base na natureza nitrogenada do composto 7E (tabela 8).

Tabela 6: Efeito de 7E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg sobre a massa corpórea e a massa úmida dos órgãos de camundongos C57BL/6 inoculados com a linhagem B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	Fígado (g/100g de massa corpórea)	Rins (g/100g de massa corpórea)	Pulmão (g/100g de massa corpórea)	Coração (g/100g de massa corpórea)	Peso corporal inicial (g)	Peso corporal final (g)
Não tratado	-	10	4,23±0,45	1,03±0,20	0,54±0,05	0,39±0,04	17,15±1,20	21,83±2,04
Doxorrubicina	0,5	9	4,86±0,97	0,99±0,17	0,65±0,08	0,39±0,06	17,05±1,75	20,94±1,82
7E	3	10	4,43±0,47	0,58±0,12	0,54±0,10	0,45±0,07	20,30±0,49	24,15±0,76
7E	10	9	4,10±1,53	0,53±0,19	0,57±0,20	0,46±0,18	19,55±0,28	21,5±0,56
7E	30	8	4,15±0,85	1,22±0,15	0,74±0,05	0,45±0,07	12,70±0,49	14,68±0,58

Resultados expressos em média ± erro. Doxorrubicina 0.5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. Não houve diferenças significativas entre animais do grupo controle (não tratado) e animais tratados.

Tabela 7: Efeito de 7E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg sobre os parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos C57BL/6 inoculados com a linhagem B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	N	Eritrócitos (10 ⁶ cél./µL)	Leucócitos totais (10 ³ cél./µL)	Contagem diferencial de leucócitos (%)				
					Basófilos	Eosinófilos	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos
Não tratado	-	9	4,06±0,27	2,70±680	0,0±0,0	0,2±0,2	25,8±1,9	71,6±1,2	2,4±1,1
Doxorrubicina	0,5	9	2,73±0,19*	2,96±342	0,0±0,0	0,0±0,0	27,6±2,5	71,6±2,9	0,8±0,5
7E	3	10	3,31±0,23	4,16±557	0,0±0,0	0,4±0,2	19±1,7	77,6±2,1	3±0,9
7E	10	9	3,74±0,36	2,67±488	0,0±0,0	0,0±0,0	23,6±3,9	77±2,1	0,8±0,4
7E	30	8	3,21±0,19	3,71±564	0,2±0,2	0,0±0,0	34,2±5,8	63,2±4,8	2,4±1,0

Resultados expressos em média ± erro. Doxorrubicina 0.5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. Não houve diferenças significativas entre animais do grupo controle (não tratado) e animais tratados.

Tabela 8: Efeito de 7E nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg sobre os parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos C57BL/6 inoculados com a linhagem B16F10 e tratados por 13 dias consecutivos, imediatamente posteriores à inoculação.

Parâmetro	Não tratado n=5	Doxo n=5	7E 3 n=5	7E 10 n=5	7E 30 n=5
TGP (ALT)	146,0±49,93	120,4±38,27	75±16,84	53±18,94	96,4±41,72
Gama-GT	13,2±5,80	12,4±7,73	8±0,54	7,2±0,73	7,8±5,26
Fosfatase alcalina	32,4±9,23	30,2±3,42	24,2±2,39	29,4±2,65	34,0±15,82
Bilirrubina total	0,2±0,07	0,1±0,09	0,2±0,04	0,28±0,06	0,24±0,11
Amilase	1426,2±168	1853,4±303	2374±434	1581±26,9	1561,6±217
BUN	24,98±5,11	26,78±4,27	34,2±5,43	26,96±2,,92	48,2±6,83*
Creatinina	0,62±0,04	0,64±0,11	0,6±0,04	0,82±0,08	0,54±0,24
BUN/Creatinina	40,18±6,91	32,1±8,76	59,28±12,69	33,3±7,7	101,3±19,48
Glicose	195,0±36,04	156,6±32,05	114±11,5	204,8±42,57	85,6±60,48
Fósforo	13,0±2,27	15,32±1,10	15,34±0,84	15,16±1,174	14,42±2,12
Cálcio	8,9±1,10	9,67±1,90	10,4±0,81	10,54±0,79	7,7±0,35
Ác. Úrico	1,05±0,07	1,30±0,14	1,97±0,72	1,64±0,2	1,73±0,40
Colesterol	74,25±22,17	109,0±29,81	93,8±13,72	80,4±7,47	60,66±17,61
Albumina	2,48±0,16	3,2±0,57	3,22±0,17	3,24±0,13	2,42±0,42
Proteínas totais	2,50±0,28	2,90±0,55	2,92±0,24	2,98±0,14	2,6±0,36

Resultados expressos em média ± erro. Doxorubicina 0.5 mg/kg foi usada como controle positivo. O controle (não tratado) recebeu o veículo (20 µL Kolifor + 20 µL DMSO + 1.960 µL salina) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias testes. *Representa valores de P<0,05 após análise por 1way ANOVA seguida de pós teste de por Student Newman-Keuls de dados de tratamento versus controle negativo (DMSO).

Adicionalmente, foram realizadas análises histológicas dos tumores, fígados, rins, corações e pulmões do animais controle e tratados através de microscopia de luz, nos aumentos finais de 4x, 100x, 200x e 400x (quando necessário). Além da coloração de rotina (hematoxilina/eosina - HE), os cortes de fígado foram submetidos à coloração pelo ácido periódico-Schiff (PAS), capaz de corar glicogênio, diferenciando os vacúolos citoplasmáticos oriundos de degeneração hidrópica daqueles relacionados ao "arraste de glicogênio".

Em cada grupo, foram analisados os tumores e órgãos de 5 animais, sendo que as descrições abaixo consideram a totalidade das alterações encontradas em cada grupo.

➤ **Tumor:**

Em todos os grupos analisados, observou-se presença de neoplasia maligna cujas células tumorais exibem intenso pleomorfismo, variando de ovais a poliédricas, arranjadas em pequenos aglomerados ou raros cordões de células. Estas células exibiram ainda cromatina grumosa, abundante, bem como citoplasma volumoso e pigmento melânico intracelular foi um achado frequente. Mitoses atípicas foram visualizadas. O estroma, por sua vez, era escasso, porém bem vascularizado, exibindo muitos vasos congestos e áreas de inflamação. Em todos os grupos, observou-se invasão muscular.

Nos grupos tratados com 7E (3, 10 e 30) e Doxorrubicina, foi visualizada extensa necrose tumoral, inflamação e inclusive áreas de microabcesso. Além disso, nos grupos 7E, foi observada uma invasão de tecido adiposo com reação fagocitária.

➤ **Fígado:**

○ **Controle negativo (Veículo com DMSO 0,1% + 0,1% de Óleo de Castor)**

De forma geral, observou-se uma desestruturação arquitetural reversível em todos os fígados analisados, inclusive com dilatação dos vasos que compõem o sistema porta. Outros achados bem evidentes e frequentes foram: necrose de coagulação centro-lobular, congestão, inflamação e degeneração hidrópica. Ressalta-se que estas alterações foram importantes, dispersas pelo órgão e proeminentes.

○ **Doxorrubicina**

Neste grupo, o tecido hepático também encontrava-se com a sua anatomia comprometida, sendo observada necrose de coagulação, inflamação mista, congestão e degeneração hidrópica. Esses eventos estavam distribuídos de forma dispersa pelo órgão. Ressalta-se que, dos 5 animais analisados, três mostravam esses aspectos mais proeminentes.

○ **7E (3, 10 e 30 mg/kg)**

As alterações histológicas nestes grupos foram moderadas. Observou-se, com frequência, congestão vascular, dilatação e atrofia do sistema porta, degeneração hidrópica, além de um infiltrado inflamatório predominantemente de células polimorfonucleares. A necrose de coagulação também foi uma alteração histológica comum, contudo, foi mais evidente nos grupos 7E 10 mg/kg e 30 mg/kg. Nestes grupos, as alterações histológicas (necrose, inflamação, congestão) foram menos evidentes quando comparadas aos controles positivo e negativo.

➤ **Pulmão:**

Os aspectos histológicos (hemorragia, atelectasia, congestão) observados neste órgão foram bem distribuídos em todos os animais e, portanto, podem estar relacionados a forma de morte dos animais.

○ **Controle negativo (Veículo com DMSO 0,1% + 0,1% Koliffor)**

As alterações arquitetural/ morfológica significante foram moderadas. Observou-se, com frequência, atelectasia, inflamação aguda importante, congestão e hemorragia, além de nódulos tumorais em três animais.

○ **Doxorrubicina**

As alterações arquitetural/ morfológicas significantes foram moderadas. Observou-se, com frequência, atelectasia, inflamação aguda importante, congestão e hemorragia. Nódulo e êmbolos tumorais foram observados em um animal.

○ **7E 3 mg/kg e 7E 10 mg/kg**

As alterações arquitetural/ morfológicas significantes destes grupos foram moderadas. Observou-se, com frequência, atelectasia, inflamação aguda importante, congestão e hemorragia.

○ **7E 30 mg/kg**

As alterações arquitetural/ morfológicas significantes variaram de moderadas a intensas. Observou-se, com frequência, atelectasia, congestão, inflamação aguda importante e hemorragia. Nódulos tumorais e êmbolos metastáticos foram observados no pulmão de um animal deste grupo.

➤ **Coração (Para todos os grupos):**

Não havia alterações arquitetural e morfológicas dignas de nota, para todos os órgãos analisados, independente do grupo experimental.

➤ **Rins (Para todos os grupos)**

De forma geral, não houve diferença entre os grupos DMSO 1%, Doxorrubicina, 7E 3, 7E 10 e 7E 30. As alterações descritas, neste órgão, foram: congestão focal, hemorragia, esclerose glomerular, dilatação tubular, inflamação focal, além de necrose glomerular e tubular discretas (não podemos descartar a influência do processo de autólise do tecido renal). Ressalta-se que estas alterações são reversíveis e foram menos acentuadas nos grupos doxorrubicina e 7E 3mg/kg.

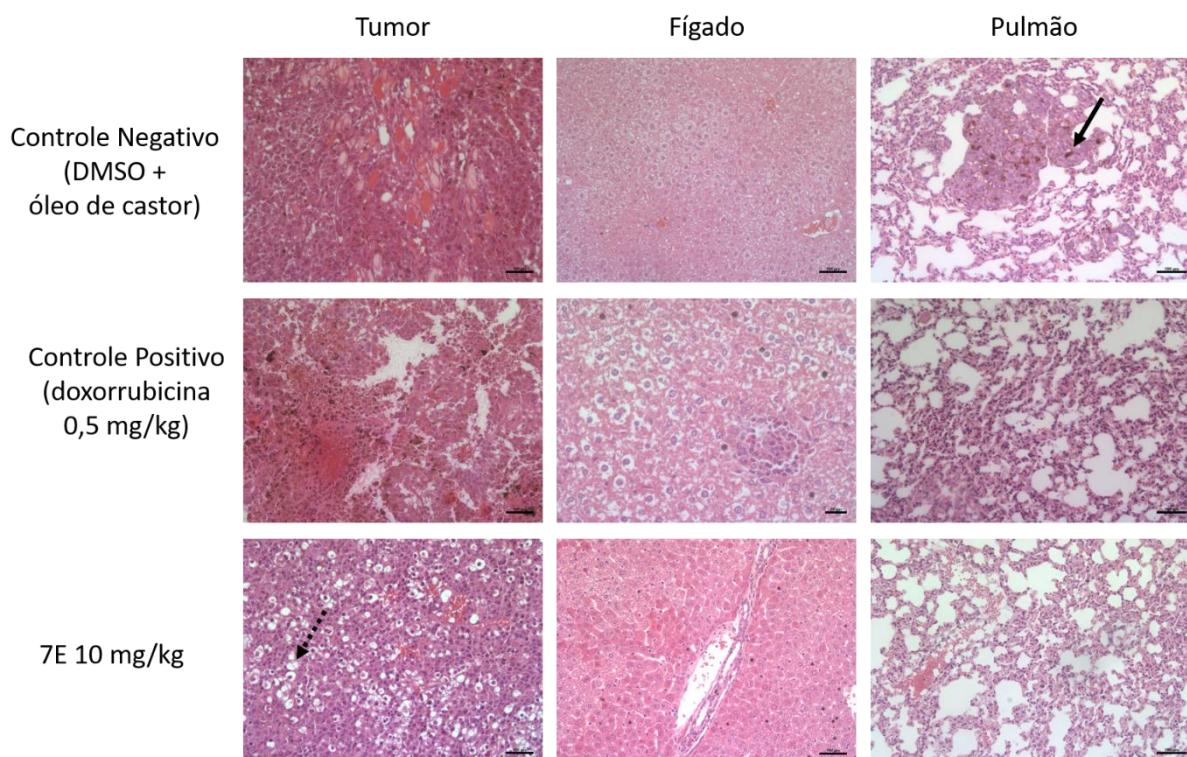


Figura 16: Efeito de 7E na concentração de 10 mg/kg sobre a histologia do tumor, fígado e pulmão de camundongos C57BL/6 tratados um vez ao dia por 13 dias por via intraperitoneal. Doxorrubicina 0,5 mg/kg foi usada no tratamento do grupo controle positivo. DMSO+óleo de Castor (0,1%) em salina foi usado no tratamento do grupo controle negativo. A seta aponta nódulos metastáticos no corte de pulmão do grupo controle negativo e a seta tracejada aponta invasão de tecido adiposo. (400x)

6 DISCUSSÃO

A introdução de novos compostos bioativos no arsenal terapêutico antineoplásico é uma necessidade constante, haja visto a grande abrangência, multiplicidade, heterogeneidade, plasticidade e gravidade da doença. No caso do melanoma essa necessidade torna-se especialmente relevante haja vista sua rápida evolução e alta letalidade (HAO *et al.*, 2015; KUDCHADKAR; GONZALEZ; LEWIS, 2013; LINDSAY; SPILIOPOULOU; WATERSTON, 2015).

Compostos nitroestirenos tem demonstrado ações antineoplásicas pontuais desde 1975. Nos últimos 10 anos, alguns derivados nitroestirenos tem sido ostensivamente estudados e suas atividades anticâncer bem descritas, demonstrando o grande potencial terapêutico da classe (DORÉ; VIEL, 1975; TSAI *et al.*, 2016).

O derivado sintético 4-cloro-1-nitro-2-feniletano (7E), já relacionado anteriormente a atividades anti-inflamatórias (VILLAR *et al.*, 2008a), estudado no presente trabalho, apresentou atividade citotóxica sobre linhagens tumorais de melanoma humano (SK-MEL-3, SK-MEL-28, SK-MEL-103 e B16F10), sarcoma uterino (MES-SA) e carcinoma colorretal (HCT116), com CI_{50} variando de 1,480 a 8,389 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 2). A CI_{50} de 7E obtida para a linhagem de melanoma humano SK-MEL-3 (3,130 $\mu\text{g/mL}$ ou 17 μM) foi significativamente menor que a obtida com o tratamento com a droga padrão doxorrubicina (3,72 $\mu\text{g/mL}$), indicando boa eficácia. Além disso, 7E apresentou CI_{50} sobre a linhagem de fibroblasto humano normal (MRC-5) significativamente mais alta do que sobre a linhagem SK-MEL-3.

Em trabalhos recentes, o composto 3'-hidroxi-4'-metoxi- β -metil- β -nitroestireno (CYT-Rx20) apresentou valores de CI_{50} de 1,12 a 5,16 $\mu\text{g/mL}$ em linhagens de câncer

de pulmão, mama e esôfago (CHIU *et al.*, 2016; HUNG *et al.*, 2016; TSAI *et al.*, 2016). Derivados do nitroestireno 2-aril-3-nitro-2H-cromeno (4a-4u) apresentaram CI_{50} de 0,4 a 12,8 μM em linhagens de câncer de mama (RAHMANI-NEZHAD *et al.*, 2014a). A IC_{50} dos derivados 1-((E)-2-nitrovinil)benzeno (NTS1) e 1-nitro-3((E)-2-nitrovinil)benzeno (NTS2) em linhagem de tumor ascético de Erlich foram de 13 e 6,5 μM , respectivamente (CALGAROTTO *et al.*, 2012b). Esses achados indicam que diversos representantes da classe têm apresentado citotoxicidade equivalente à do composto 7E.

Para averiguar os efeitos de 7E no ciclo celular de SK-MEL-3 o ensaio de citometria com marcação de PI foi realizado, no qual foi possível perceber a fragmentação do DNA induzida por 7E, com o aumento do percentual de células na fase sub-G1 do ciclo, confirmando-se a citotoxicidade (tabela 3). Em contraste, CYT-Rx induziu parada do ciclo celular de linhagens de câncer de pulmão na fase G2/M (TSAI *et al.*, 2016) bem como de células de câncer de mama (HUNG *et al.*, 2016).

O estudo do mecanismo de morte celular deflagrado por antineoplásicos é necessário à compreensão das aplicações clínicas do seu uso e de seus possíveis efeitos tóxicos e colaterais. A indução de necroptose está relacionada à ativação de intenso processo inflamatório, o mesmo não ocorre na indução de apoptose. De acordo com os dados obtidos na análise morfológica e citométrica (anexina/PI) (figuras 13 e 14), 7E induz externalização de fosfatidilserina, evento compatível com a ocorrência de apoptose. O mesmo mecanismo de morte foi induzido pelos compostos CYT-Rx20, NTS1, NTS2 e por dois derivados do nitroestireno 2-aril-3-nitro-2H-cromeno (4h e 4l) (CALGAROTTO *et al.*, 2012b; CHIU *et al.*, 2016; HUNG *et al.*, 2016; RAHMANI-NEZHAD *et al.*, 2014a; TSAI *et al.*, 2016).

Existem evidências significativas de que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs e ERNs) desempenham um papel duplo no organismo, de modo que elas tanto participam de processos fisiológicos benéficos importantes quanto são capazes de induzir danos oxidativos, disfunções teciduais e orgânicas (BOLISSETTY; JAIMES, 2013; SENA; CHANDEL, 2012; VARA; PULA, 2014; ZHENG *et al.*, 2017).

Nos organismos vivos, EROs e ERNs são geradas em sistemas localizados nas membranas plasmáticas, no citosol, nos perossissomos, no retículo endoplasmático e, sobretudo, nas mitocôndrias. Eles desempenham papel fisiológico, entre outros exemplos, na regulação do sistema imunológico, cardiovascular, sistema nervoso central e reprodutivo. No entanto, perturbações na produção intracelular dessas espécies ou no sistema de controle antioxidante celular deflagram situações patológicas, que podem culminar no mal funcionamento e até na morte celular. Alguns agentes quimioterápicos se baseiam nessa abordagem, causando superprodução de EROs/ERNs, que interferem com a estabilidade mitocondrial, levando a morte celular. Tem-se demonstrado que EROs/ ERNs são capazes de ativar cascatas de sinalização intracelular envolvendo muitas proteínas quinases mitógeno ativadas (MAPK), incluindo JNK e p38, que estão intimamente relacionadas à apoptose (DI MEO *et al.*, 2016).

Assim como ocorreu em outras linhagens com o derivado nitroestireno CYT-RX20 (CHIU *et al.*, 2016; HUNG *et al.*, 2016; TSAI *et al.*, 2016), o tratamento de células de melanoma (SK-MEL-3) com composto 7E provocou acúmulo intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (gráfico 6). Adicionalmente, pudemos evidenciar especificamente o acúmulo de superóxido e nitrito (gráficos 7 e 8).

NO[•] é um radical livre altamente reativo capaz de interagir com outros radicais livres, oxigênio molecular e metais pesados. Os efeitos biológicos do NO[•] podem ser mediados pela produção de seus metabólitos, como nitrato, peroxinitrato e nitrito. Acredita-se que esses metabólitos desempenham efeitos genotóxicos, que incluem dano ao DNA, podendo ser provocado por desaminação nitroativa, quebra de cadeia ou modificação do DNA (XU *et al.*, 2002).

Desde meados de 1987 há relatos de que o gás NO[•] esteja envolvido nos mecanismos de defesa primária contra células malignas ou infectadas por microorganismos intracelulares. Muitos laboratórios já demonstraram que agentes liberadores de NO[•] podem matar células tumorais, mostrando que essa abordagem pode funcionar no tratamento antitumoral (HIBBS; TAINTOR; VAVRIN, 1987).

Wang e colaboradores (2010) demonstraram que a indução da formação de NO[•] pelo flavonoide silibinina é um dos fatores que contribuem para sua eficácia antitumoral sobre linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7) por via dependente de MAPK. Ahn e colaboradores (2014) e Kaushik e colaboradores (2015) usaram jato de plasma em pressão atmosférica para induzir a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais provocaram apoptose em células HeLa, pelas vias das MAPK: JNK, p38 e ERK. Conforme demonstrado por Heinrich e colaboradores (2014) o tratamento do câncer pela técnica de terapia fotodinâmica pode ser potencializado pela geração de NO[•].

Sabendo-se que a via da apoptose intrínseca dependente de caspase é uma importante via de morte celular deflagrada pelo estresse oxidativo, investigamos os efeitos do tratamento com 7E sobre a despolarização mitocondrial e expressão de caspase-9 clivada, caspase-3 clivada e Bcl-2, que são, respectivamente, a caspase

iniciadora ativada, a caspase efetora ativada e um regulador antiapoptótico dessa via. Vale ressaltar que as caspases ocorrem no meio intracelular constitutivamente na sua forma desativada, pró-caspases, sendo necessária a sua clivagem para a efetiva ação apoptótica (ELMORE, 2007). O composto 7E provocou alteração do potencial de membrana mitocondrial (Figura 15 e gráfico 10), aumento da expressão das caspases 9 e 3 (gráficos 11 e 12) e redução da expressão de Bcl-2 (gráfico 13), demonstrando ser capaz de atuar por essa via de apoptose, assim como outros derivados nitroestirenos.

Calgarotto e colaboradores (2012) demonstraram que os derivados nitroestirenos NTS1 e NTS2 levaram à ativação de caspase-3 em células de tumor ascítico de Erlich, bem como induziram liberação de CTYC, uma proteína citotóxica do espaço intermembranar da mitocôndria. Rahmani-Nezhad e colaboradores (2014) demonstraram que a apoptose induzida pelos derivados nitroestirenos 4h e 4l é dependente da ativação de caspase 3. Chen e colaboradores (2015) demonstraram que o derivado nitroestireno provoca anoikis em linhagens de câncer de mama por meio da redução da expressão de pró-caspase 3 e de membros antiapoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2 e Bcl-x), além de provocar o aumento da atividade de caspase-3 e da expressão de membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 (BAX e BAK), responsáveis pela formação de poros na membrana mitocondrial externa, que levam à alteração do potencial de membrana mitocondrial, permeabilização da mitocôndria e liberação de proteínas tóxicas do espaço intermembranar.

Mais recentemente Tsai e colaboradores (2016) demonstraram que linhagens de câncer pulmonar sofrem apoptose por redução da expressão de pró-caspases em decorrência do tratamento com o derivado nitroestireno CYT-Rx20. E Hung e colaboradores (2016) demonstraram que CYT-Rx20 também diminuiu a expressão de

pró-caspases (8, 9 e 3) e aumentou a expressão de caspase-7 clivada em células de adenocarcinoma de mama. Chiu e colaboradores (2016) demonstraram que o mesmo composto, CYT-Rx20, induziu redução da expressão de pró-caspases 8, 9 e 3 em células de tumor esofágico.

Para explorar os mecanismos de morte celular subjacentes induzidos pelo composto 7E na linhagem de melanoma SK-MEL-3 investigamos seus efeitos sobre expressão de p-JNK, p-ERK e p-38, importantes MAPK no processo de sinalização intracelular de morte (SUI *et al.*, 2014). JNK e ERK sofrem efeitos diretos do acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio intracelulares, tornando-se ativas. ERK fosforilada pode participar do processo de morte celular atuando diretamente sobre a mitocôndria ou núcleo. JNK, quando ativada, tem efeito inibidor da ação antiapoptótica de Bcl-2, o que pode estar contribuindo para a redução da expressão relatada anteriormente. Além disso, p-JNK induz a ativação de p38, que pode deflagrar diversos eventos celulares como parada de ciclo, diferenciação celular, senescência e apoptose, por meio da ativação de caspase 8, FAS e dano ao DNA.

O composto 7E induziu aumento da expressão de p-JNK, p-ERK e p-38 (gráficos 14, 15 e 16). A sinalização por MAPK é uma das vias de comunicação intracelular mais extensivamente investigada dos cânceres humanos. As MAPK atraem cada vez mais atenção quando se trata de terapia antitumoral. JNK e p-38 são alvos interessantes na sensibilização de células tumorais. Já se tem demonstrado inequivocadamente que p38 e JNK podem mediar apoptose e autofagia em resposta a estímulos extracelulares, como agentes quimioterápicos. Muitos medicamentos antineoplásicos requerem a ativação de p38 na indução de apoptose, como a ciclofosfamida, retinóides (como o ácido transretinóico, ATRA), antocianinas, cisplatina e oxaliplatina (LENASSI; PLEMENITAS, 2006; SUI *et al.*, 2014).

A via das MAPK JNK, ERK e p38 é o alvo da ação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no trabalho de Ahn e colaboradores (2014). As 3 MAPK são superexpressas pelo tratamento com jato de plasma a pressão atmosférica, resultando na morte celular da linhagem de câncer cervical (HeLa). O efeito apoptótico é suprimido pelo pré-tratamento das células com antioxidante, inibidores ou siRNA de JNK e p38. Da mesma maneira Kaushik e colaboradores (2015) observaram que tanto o *soft jet plasma* quanto indutores químicos induziram morte celular nas linhagens T98G, A549, HEK293 e MRC5 em decorrência da alteração do potencial de membrana, associado à *up-regulation* da expressão de mRNA BAX e BAK, bem como ao aumento da expressão proteica de ERK 1/2.

Em contraste, um estudo feito por Bartels e colaboradores (2014), os nitroestirenos NTS1 e NTS2 inibiram a expressão da via p38MAPK, efeito seguido da recuperação mielóide decorrente da depressão da medula óssea causada por quimioterapia *in vitro* e *in vivo*. Ao inibir essa via, compostos estimularam a expansão e diferenciação de progenitores mielóides.

O composto CYP-Rx20, assim como 7E, também foi capaz de interferir com a via das MAPK. Experimentos realizados por Hung e colaboradores (2016) utilizando linhagens de câncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7 e ZR75-1) revelaram que o composto aumenta a expressão de ERK 1/2, estimulada por EROs, o que resulta na morte das linhagens por autofagia, haja visto que também há superexpressão de Beclin-1 em decorrência do tratamento. O pré-tratamento das células com antioxidante inibe tanto a superexpressão de ERK 1/2 e Beclin-1, quanto a morte celular decorrente do tratamento das células com o composto.

Adicionalmente nós observamos a ocorrência de 9 genes relacionados à carcinogênese superexpressos em SK-MEL-3 em decorrência do tratamento com 7E, além de 24 genes subexpressos. Entre eles destacamos os superexpressos FAS e MAPK8 e os subexpressos KRAS, SOS1 e MYC (tabela 4).

FAS decodifica um receptor de sinal de morte, iniciador da via de apoptose extrínseca, e sua superexpressão está relacionada à indução de apoptose em uma série de células tumorais, entre elas células dendríticas, fibrosarcoma, carcinoma escamoso oral, colangiosarcoma, linfócitos, adenocarcinoma de mama, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer hepático, entre outros (BOUEROY *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2003b; KOYA *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2016; LV *et al.*, 2017; RAY *et al.*, 2016; SHINOURA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2016a; YU *et al.*, 2016). A superexpressão de FAS pode ser desencadeada pela ação da proteína p38 fosforilada, a qual demonstramos estar superexpressas em decorrência do tratamento com 7E.

MAPK8 é o gene que decodifica a proteína quinase 8 mitógeno ativada, conhecida como JNK, um dos mais atrativos alvos de intervenção na terapia antitumoral na atualidade, a qual também demonstramos estar superexpressa na sua forma fosforilada (BUBICI; PAPA, 2014; FLEUREN *et al.*, 2016). Portanto, a superexpressão de FAS e MAPK8 corrobora com a observação de que nosso composto atua pela via das MAPK na indução de apoptose na linhagem de melanoma estudada.

Mutações nos oncogenes que decodificam as proteínas GTPases RAS (NRAS, HRAS e KRAS) ocorrem frequentemente nos tumores humanos, inclusive nos melanomas. As proteínas RAS controlam vias de sinalização de proliferação celular,

sendo assim, o aumento de sua expressão ou atividade está relacionada à transformação maligna, sobretudo a proteína KRAS. Embora KRAS seja considerada um alvo promissor, atualmente não há nenhuma terapia efetiva envolvendo fármacos guiados para atuarem sobre suas mutações somáticas (BIRKELAND *et al.*, 2012; DOWNWARD, 2003; FERNÁNDEZ-MEDARDE; SANTOS, 2011; KIM *et al.*, 2015; MISALE *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016b).

O gene SOS1 decodifica uma proteína chamada “Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1”, que também participa da via de sinalização de RAS (DE; DERMAWAN; STARK, 2014; DEPEILLE *et al.*, 2015; TIMOFEEVA *et al.*, 2009). A subexpressão de KRAS e SOS1 induzida por 7E pode estar colaborando para a apoptose observada e ainda para uma regulação fenotípica menos agressiva da população de células que permanece viável após serem expostas ao composto.

MYC é um oncogene que, entre outras ações, induz proliferação celular. Ele encontra-se amplificado em muitos tumores humanos e é associado a fenótipos de mal prognóstico. A subexpressão de MYC, está relacionada à melhor resposta à terapia, indução de morte em algumas linhagens tumorais e regressão tumoral *in vivo*, sobretudo quando está relacionada à subexpressão de BCL-2, anteriormente relatada em decorrência do tratamento com 7E (AHN; YOON, 2017; BARBOSA, 2012; KUMAR MONGRE *et al.*, 2017; SHAN *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2017).

Os experimentos *in vivo* revelaram que os efeitos *in vitro* de 7E se traduzem na redução de cerca de 50% do crescimento tumoral em modelo de melanoma murino, no qual utilizou-se a linhagem B16F10 em camundongos C57BL/6. Adicionalmente, não houve alterações hematológicas significativas associadas ao tratamento com 7E por 13 dias consecutivos nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg. As alterações histológicas

observadas foram semelhantes às aquelas observadas no grupo controle negativo e menos proeminentes que às aquelas observadas no grupo controle positivo. A única alteração bioquímica observada foi o aumento de uréia nitrogenada, o que pode ser devido à excreção renal do composto, que tem natureza nitrogenada.

No trabalho de Chiu e colaboradores (2016) o derivado nitroestireno CYT-Rx20 também apresentou eficácia *in vivo*, promovendo a inibição de mais de 50% do crescimento de tumor esofágico em modelo ortotópico. Na ocasião não foram observadas alterações bioquímicas e histológicas (esôfago, coração, fígado, pulmão, baço e rim) importantes associadas ao tratamento com o composto por quatro semanas, três vezes por semana. Adicionalmente, a análise histoquímica do tumor revelou redução na expressão de Ki-67, marcadora de proliferação celular, e STAT3, relacionada ao processo de migração e metástase.

Tsai e colaboradores (2016) reportaram efeito semelhante de CYT-Rx20. Nessa ocasião o composto foi administrado por quatro semanas, três vezes por semana, e inibiu mais de 50% do crescimento de tumor de pulmão em modelo xenográfico. Não foram observadas alterações relevantes no peso corporal, nos parâmetros bioquímicos e histológicos (pulmão, fígado, baço, rim, coração e cólon). A análise histoquímica dos tumores apontou o aumento do nível de caspase-3 clivada e redução do nível do sistema antioxidante glutathiona-redutase.

Observações equivalentes foram feitas por Hung e colaboradores (2016), também relativas ao uso de CYP-Rx20 por 4 semanas, três vezes por semana, mas dessa vez em modelo de tumor xenográfico de mama. Houve mais de 50% de inibição do crescimento tumoral, associada ao aumento da expressão de ERK 1/2, LC-3 e

malondialdeído, de acordo com a análise histoquímica, que são marcadores da ativação de vias de morte celular, autofagia e estresse oxidativo, respectivamente.

Os compostos nitroestirenos NTS1 e NTS2 também foram analisados em uma abordagem *in vivo* em modelo de tumor ascético de Erlich por Bartels e colaboradores (2014). O tratamento foi capaz de inibir o crescimento tumoral e estimular a recuperação medular pós quimioterapia.

O modelo de mecanismo de morte celular proposto para o composto 7E, com base em nossas observações experimentais, está representado na figura 16 a seguir.

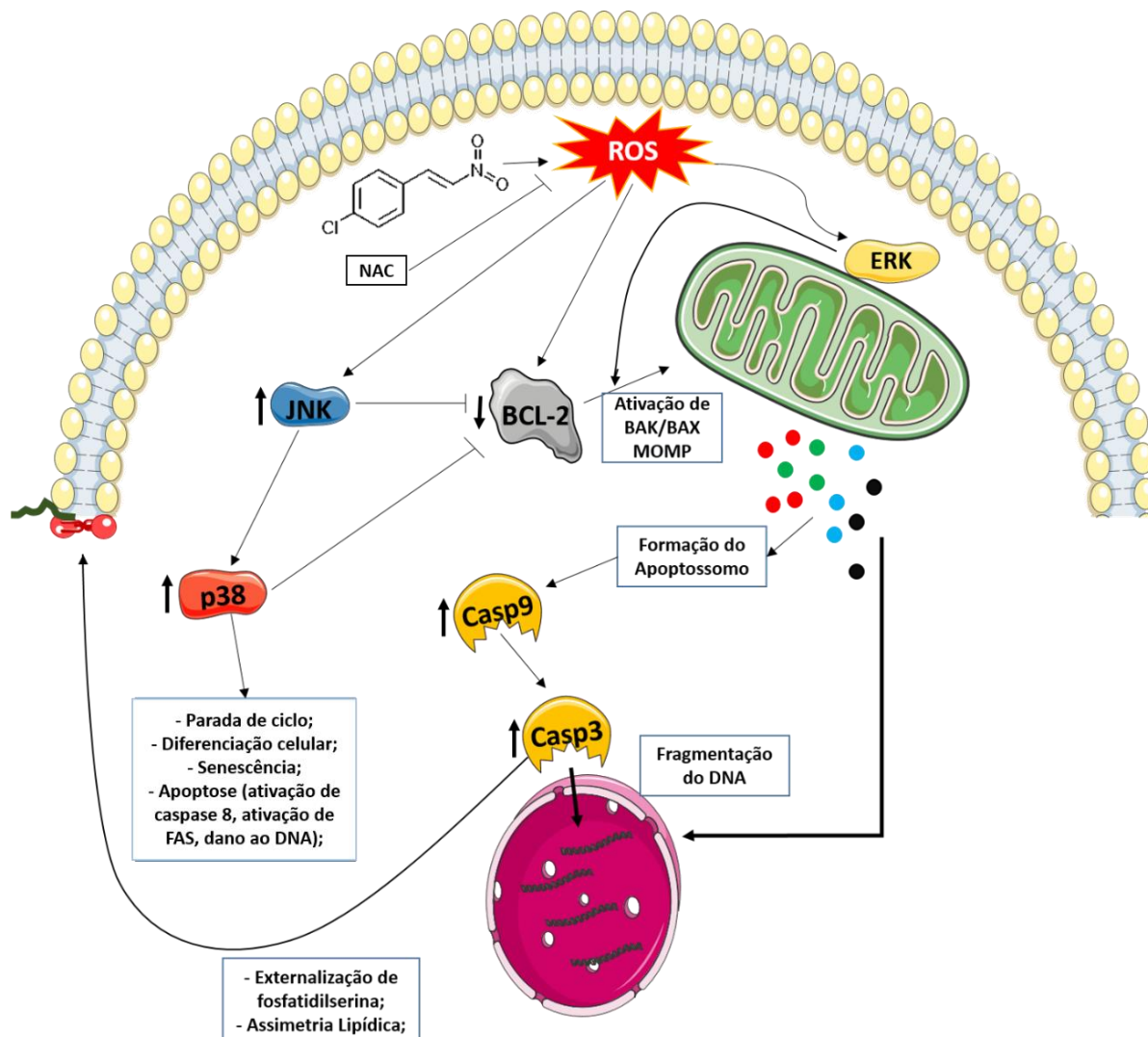


Figura 17: Proposta de modelo de mecanismos de morte celular ativados pelo tratamento da linhagem de melanoma SK-MEL-3 com o derivado nitroestireno 7E. 7E induz ao acúmulo de EROs e ERNs, causando aumento da expressão de JNK, p38 e ERK e redução da expressão de Bcl-2, o que leva à despolarização mitocondrial, provável permeabilização da membrana externa da mitocôndria e liberação de proteínas citotóxicas (DIABLO/Smac, AIF, ENDOG e CYTC), ativação de caspase-9 e caspase-3, resultando em morte celular por apoptose. O pré-tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína (NAC) inibe a morte celular causada por 7E, confirmando a importância da participação de EROs/ERNs no processo.

7 CONCLUSÃO

Nossas observações experimentais mais relevantes relativas às ações de 7E indicam que o composto é citotóxico sobre uma variedade de linhagens tumorais, sobretudo melanoma. O composto induz ao acúmulo de EROs e ERNs, causando aumento da expressão de JNK, p38 e ERK e redução da expressão de Bcl-2. Isso leva à despolarização mitocondrial, provável permeabilização da membrana externa da mitocôndria e liberação de proteínas citotóxicas (DIABLO/Smac, AIF, ENDOG e CYTC), ativação de caspase-9 e caspase-3, resultando em morte celular por apoptose. Os efeitos de 7E são antagonizados pelo pré-tratamento com antioxidante (NAC), confirmando a inequívoca importância do acúmulo de EROs/ERNs nesse processo. 7E possui ainda efetiva ação *in vivo* promovendo inibição do crescimento tumoral. Sendo assim, 7E tem potencial para ser desenvolvido como agente quimioterápico, sendo necessário mais estudos pré-clínicos e clínicos, que confirmarão sua utilidade na terapia antitumoral, sobretudo sobre o melanoma.

8 REFERÊNCIAS

A.K.S., S.; K.T., F. BRAF in melanoma: Current strategies and future directions. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 7, p. 4326–4334, 2013.

AHMED, S. A.; GOGAL, 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.

AHN, H. J. et al. Targeting cancer cells with reactive oxygen and nitrogen species generated by atmospheric-pressure air plasma. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

AHN, M.-Y.; YOON, J.-H. Histone deacetylase 7 silencing induces apoptosis and autophagy in salivary mucoepidermoid carcinoma cells. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 8 fev. 2017.

AL MAJID, A. M. A. et al. Facile and promising method for michael addition of indole and pyrrole to electron-deficient trans- β -nitroolefins catalyzed by a hydrogen bond donor catalyst Feist's acid and preliminary study of antimicrobial activity. **TheScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 649197, jan. 2014.

BALCH, C. M. et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199–6206, 2009.

BARBOSA, G. **Atividade anticâncer da biflorina em células tumorais gástricas**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas - UFAM, 2012.

BARTELS, M. et al. Differential effects of nitrostyrene derivatives on myelopoiesis involve regulation of C/EBP α and p38MAPK activity. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e90586, 2014.

BELLO, D. M.; ARIYAN, C. E.; CARVAJAL, R. D. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. **Cancer Control**, v. 20, p. 261–281, 2013.

BILICH, B. E.; CHERKASOV, V. M.; VLADIMIRTSEV, I. F. Anticandida properties of certain derivatives of beta-nitrostyrene. **Vestnik dermatologii i venerologii**, v. 44, n. 1, p. 55–8, jan. 1970.

BIRKELAND, E. et al. KRAS gene amplification and overexpression but not mutation associates with aggressive and metastatic endometrial cancer. **British journal of cancer**, v. 107, n. 12, p. 1997–2004, 4 dez. 2012.

BOLISSETTY, S.; JAIMES, E. A. Mitochondria and reactive oxygen species: Physiology and pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6306–6344, 2013.

BOUEROY, P. et al. Antitumor effect of forbesione isolated from *Garcinia hirsuta* on cholangiocarcinoma in vitro and in vivo. **Oncology**

Letters, v. 12, n. 6, p. 4685–4698, 18 out. 2016.

BRAF GENE. BRAF B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/673>>. Acesso em: 31 out. 2015.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 357 , de 8 de abril de 2013, Aprova Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo, 2013.

BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 3, p. 231–237, 2005.

BUBICI, C.; PAPA, S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. **British journal of pharmacology**, v. 171, n. 1, p. 24–37, jan. 2014.

CAGNOL, S.; CHAMBARD, J. C. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - Apoptosis, autophagy and senescence. **FEBS Journal**, v. 277, n. 1, p. 2–21, 2010.

CALGAROTTO, A. K. et al. Autophagy inhibited Ehrlich ascitic tumor cells apoptosis induced by the nitrostyrene derivative compounds: relationship with cytosolic calcium mobilization. **European journal of pharmacology**, v. 678, n. 1–3, p. 6–14, 5 mar. 2012a.

CALGAROTTO, A. K. et al. Autophagy inhibited Ehrlich ascitic tumor cells apoptosis induced by the nitrostyrene derivative compounds: Relationship with cytosolic calcium mobilization. **European Journal of Pharmacology**, v. 678, n. 1–3, p. 6–14, 5 mar. 2012b.

CALLAHAN, M. K.; POSTOW, M. A.; WOLCHOK, J. D. Immunomodulatory therapy for melanoma: Ipilimumab and beyond. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 2, p. 191–199, 2013.

CARTER, K. C. et al. The effect of nitrostyrene on cell proliferation and macrophage immune responses. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 24, n. 2, p. 187–97, maio 2002.

CDK4 GENE. CDK4 cyclin-dependent kinase 4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1019>>. Acesso em: 31 out. 2015.

CDKN2A GENE. CDKN2A cyclin-dependent kinase inhibitor 2A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1029>>. Acesso em: 31 out. 2015.

CHAABANE, W. et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 61, n. 1, p. 43–58, mar. 2013.

CHEN, I.-H. et al. 3,4-Methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits adhesion and migration of human triple-negative breast cancer cells by suppressing β 1 integrin function and surface protein disulfide isomerase. **Biochimie**, v. 110, p. 81–92, mar. 2015a.

CHEN, I.-H. et al. HPW-RX40 restores anoikis sensitivity of human breast cancer cells by inhibiting integrin/FAK signaling. **Toxicology and applied pharmacology**, 18 set. 2015b.

CHEN, I.-H. et al. HPW-RX40 restores anoikis sensitivity of human breast cancer cells by inhibiting integrin/FAK signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 2, p. 330–340, 1 dez. 2015c.

CHIU, W.-C. et al. The Synthetic β -Nitrostyrene Derivative CYT-Rx20 Inhibits Esophageal Tumor Growth and Metastasis via PI3K/AKT and STAT3 Pathways. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166453, 22 nov. 2016.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free radical biology & medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–62, 15 mar. 2010.

COSTA-LOTUFO, L. V et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer : Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará The Contribution of Natural Products as Source of New Anticancer Drugs : Studies Carr. v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

COSTA, E. V. et al. Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Med**, p. 6, 2015.

CRUZ, A. C. et al. Fas/CD95 prevents autoimmunity independently of lipid raft localization and efficient apoptosis induction. **Nature Communications**, v. 7, p. 13895, 23 dez. 2016.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–54, 27 jun. 2002.

DE, S.; DERMAWAN, J. K. T.; STARK, G. R. EGF receptor uses SOS1 to drive constitutive activation of NF κ B in cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 32, p. 11721–6, 12 ago. 2014.

DEPEILLE, P. et al. RasGRP1 opposes proliferative EGFR-SOS1-Ras signals and restricts intestinal epithelial cell growth. **Nature cell biology**, v. 17, n. 6, p. 804–15, jun. 2015.

DHAWAN, V. Studies on Respiratory Disorders. In: PAWANKAR, R. et al. (Eds.). . **Studies on Respiratory Disorders, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice**. 1. ed. New York: Springer Science+Business Media, 2014. p. 27–42.

DI MEO, S. et al. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

DORÉ, J. C.; VIEL, C. Cytotoxic and antitumoral activity of beta-nitrostyrenes and of composed nitrovinyl derivatives. **II Farmaco; edizione scientifica**, v. 30, n. 2, p. 81–109, fev. 1975.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11–22, jan. 2003.

EGGERMONT, A. M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816–827, 2014.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ERUSLANOV, E.; KUSMARTSEV, S. **Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry**. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. v. 594

FDA. **EVEROLIMUS: FDA Approved Drug Products**. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.searchaction&SearchTerm=everolimus&SearchType=BasicSearch&#totable>>. Acesso em: 1 nov. 2015.

FDA. **FDA Approval for Trametinib - National Cancer Institute**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-trametinib>>. Acesso em: 1 nov. 2015.

FERNÁNDEZ-MEDARDE, A.; SANTOS, E. Ras in cancer and developmental diseases. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 344–58, mar. 2011.

FLEUREN, E. D. G. et al. The kinome “at large” in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 2, p. 83–98, 29 jan. 2016.

FOLETTTO, M. C.; HAAS, S. E. Cutaneous melanoma: new advances in treatment. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 301–310, 2014.

FRESHNEY, I. **CULTURE OF HUMAN STEM**. [s.l.: s.n.].

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–20, jan. 2012.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell death and differentiation**, n. 2014, p. 1–16, 2014.

GAO, S. et al. Growth inhibitory effect of paratocarpin E, a prenylated chalcone isolated from *Euphorbia humifusa* Wild., by induction of autophagy and apoptosis in human breast cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 121–128, dez. 2016.

GRISHAM, M. B.; JOHNSON, G. G.; LANCASTER, J. R. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods in enzymology**, v. 268, p. 237–46, jan. 1996.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HAO, M. et al. Advances in targeted therapy for unresectable melanoma: new drugs and combinations. **Cancer letters**, v. 359, n. 1, p. 1–8, 1 abr. 2015.

HE, Y. et al. 3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 2, p. 1142–50, 10 jan. 2014.

HEINRICH, T. A. et al. Production of reactive oxygen and nitrogen species by light irradiation of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex as a strategy for cancer treatment. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 10, p. 4021, 14 mar. 2014.

HEPPT, M. V et al. Combination therapy of melanoma using kinase inhibitors. **Current opinion in oncology**, v. 27, n. 2, p. 134–40, mar. 2015.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science (New York, N.Y.)**, v. 235, n. 4787, p. 473–6, 23 jan. 1987.

HSIEH, P. W. et al. The synthesis and biologic evaluation of anti-platelet and cytotoxic β -nitrostyrenes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 21, p. 7621–7627, 2010.

HUNG, A. C. et al. The synthetic β -nitrostyrene derivative CYT-Rx20 induces breast cancer cell death and autophagy via ROS-mediated MEK/ERK pathway. **Cancer Letters**, v. 371, n. 2, p. 251–261, 28 fev. 2016.

IARC, I. A. FOR R. ON C. **Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 26 out. 2015.

ICHIM, GABRIEL; TAIT, S. W. G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 8, p. 539–548, 2016.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf>>. Acesso em: 2 abr. 2014.

INCA. **Instituto Nacional do Cancer - Estimativa 2016** Ministério Da Saúde. [s.l: s.n.].

JHAPPAN, C.; NOONAN, F. P.; MERLINO, G. **Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma**. Disponível em: <<http://www.nature.com/onc/journal/v22/n20/pdf/1206450a.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2015.

JIANG, Y. et al. STAT1 mediates transmembrane TNF-alpha-induced formation of death-inducing signaling complex and apoptotic signaling via TNFR1. **Cell Death and Differentiation**, 10 fev. 2017.

JOHNSON, D. B.; PENG, C.; SOSMAN, J. A. Nivolumab in melanoma: latest evidence and clinical potential. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 7, p. 97–106, 2015.

KAAP, S. et al. Structure activity analysis of the pro-apoptotic, antitumor effect of nitrostyrene adducts and related compounds. **Biochemical pharmacology**, v. 65, n. 4, p. 603–10, 15 fev. 2003.

KAUSHIK, N. et al. Responses of Solid Tumor Cells in DMEM to Reactive Oxygen Species Generated by Non-Thermal Plasma and Chemically Induced ROS Systems. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8587, 26 fev. 2015.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 3, p. 221–37, mar. 2011.

KHAN, F. et al. Ajwa Date (*Phoenix dactylifera* L.) Extract Inhibits Human Breast Adenocarcinoma (MCF7) Cells *In vitro* by Inducing Apoptosis and Cell Cycle Arrest. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0158963, 21 jul. 2016.

KIM, J. H. et al. Potent inhibition of human telomerase by nitrostyrene derivatives. **Molecular pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 1117–24, maio 2003a.

KIM, P. K. M. et al. Fas-associating death domain protein overexpression induces apoptosis in lung cancer cells. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 125, n. 6, p. 1336–42, jun. 2003b.

KIM, R.-K. et al. Activation of KRAS promotes the mesenchymal features of basal-type breast cancer. **Experimental & molecular medicine**, v. 47, n. 1, p. e137, 30 jan. 2015.

KIRKWOOD, J. M. Progression of cutaneous melanoma: implications for treatment - Springer. v. 29, n. 7, p. 775–796, 2015.

KIT GENE. **Kit kit oncogene [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16590>>. Acesso em: 31 out. 2015.

KOYA, T. et al. Interferon- α -inducible Dendritic Cells Matured with OK-432 Exhibit TRAIL and Fas Ligand Pathway-mediated Killer Activity. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42145, 13 fev. 2017.

KRAUS, S. L.; HAENSSLE, H. A. Early detection of cutaneous melanoma by sequential digital dermatoscopy (SDD). **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, v. 11, p. 509–12, 2013.

KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **The Journal of cell biology**, v. 66, n. 1, p. 188–93, jul. 1975.

KUDCHADKAR, R. R.; GONZALEZ, R.; LEWIS, K. New targeted therapies in

melanoma. **Cancer Control**, v. 20, n. 4, p. 282–288, 2013.

KUETHE, J. T. et al. Synthesis of 5-substituted-1H-indol-2-yl-1H-quinolin-2-ones: a novel class of KDR kinase inhibitors. **The Journal of organic chemistry**, v. 70, n. 7, p. 2555–67, 1 abr. 2005.

KUMAR MONGRE, R. et al. Novel phyto-derivative BRM270 inhibits hepatocellular carcinoma cells proliferation by inducing G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in xenograft mice model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 741–754, mar. 2017.

KUNZ, M. Oncogenes in melanoma: an update. **European journal of cell biology**, v. 93, n. 1–2, p. 1–10, jan. 2013.

LENASSI, M.; PLEMENITAS, A. The role of p38 MAP Kinase in cancer cell apoptosis. **Radiol Oncol**, p. 51–56, 2006.

LETAVIC, M. A. et al. Novel naphthyridines are histamine H3 antagonists and serotonin reuptake transporter inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 9, p. 2566–9, 1 maio 2007.

LILJANA MERVIC. Prognostic factors in patients with localized primary cutaneous melanoma. **Acta Dermatovenerologica Alpina**, v. 21, p. 27–31, 2012.

LINDSAY, C. R.; SPILIOPOULOU, P.; WATERSTON, A. Blinded by the light: why the treatment of metastatic melanoma has created a new paradigm for the management of cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 7, p. 107–121, 2015.

LIU-SMITH, F.; DELLINGER, R.; MEYSKENS, F. L. Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 563, n. April, p. 51–55, 2014.

LIU, Y. et al. JAK2 inhibitor combined with DC-activated AFP-specific T-cells enhances antitumor function in a Fas/FasL signal-independent pathway. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 9, p. 4425–4433, jul. 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LO, J. A.; FISHER, D. E. The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6212, p. 945–9, 2014.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, n. 4, p. 643–649, 1964.

LV, Y. et al. Antiproliferative and Apoptosis-inducing Effect of exo-Protoporphyrin IX based Sonodynamic Therapy on Human Oral Squamous Cell

Carcinoma. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40967, 19 jan. 2017.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 601–620, abr. 2007.

MC1R GENE. **MC1R melanocortin 1 receptor (alpha melanocyte stimulating hormone receptor) [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4157>>. Acesso em: 31 out. 2015.

MCNAMARA, Y. M. et al. Synthesis and serotonin transporter activity of 1,3-bis(aryl)-2-nitro-1-propenes as a new class of anticancer agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 19, n. 3, p. 1328–48, 1 mar. 2011.

MEGAHED, A. I.; KOON, H. B. What is the role of chemotherapy in the treatment of melanoma? **Current treatment options in oncology**, v. 15, n. 2, p. 321–35, jun. 2014.

MEIERJOHANN, S. Oxidative stress in melanocyte senescence and melanoma transformation. **European journal of cell biology**, v. 93, n. 1–2, p. 36–41, jan. 2014.

MESSERSCHMITT, P. J. et al. Osteosarcoma Phenotype Is Inhibited by 3,4-Methylenedioxy- β -nitrostyrene. **Sarcoma**, v. 2012, p. 479712, jan. 2012.

MIKAMI, Y. et al. Antifungal activity of SL-1, a beta-nitrostyrene type pigment and its synthetic congeners. **The Journal of antibiotics**, v. 44, n. 12, p. 1454–6, dez. 1991.

MILHAZES, N. et al. Beta-nitrostyrene derivatives as potential antibacterial agents: a structure-property-activity relationship study. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 12, p. 4078–88, 15 jun. 2006.

MISALE, S. et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. **Nature**, v. 486, n. 7404, p. 532–6, 28 jun. 2012.

MITF GENE. **MITF microphthalmia-associated transcription factor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4286>>. Acesso em: 31 out. 2015.

MODICA-NAPOLITANO, J. S.; WEISSIG, V. Treatment strategies that enhance the efficacy and selectivity of mitochondria-targeted anticancer agents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 17394–17421, 2015.

MONTENEGRO, R. C. et al. Pisosterol induces monocytic differentiation in HL-60 cells. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 21, n. 5, p. 795–800, ago. 2007.

MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Mechanism of toxicity of nitro compounds

used in the chemotherapy of trichomoniasis. **Environmental health perspectives**, v. 64, p. 199–208, dez. 1985.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1833, n. 12, p. 3448–59, dez. 2013.

NIKOLOVA, T. et al. Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1868, n. 1, p. 29–39, 2017.

NRAS GENE. **NRAS neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4893>>. Acesso em: 31 out. 2015.

OIKONOMOU, E. et al. BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p. 11752–77, 15 dez. 2014.

OLIVEIRA, J. P. **Validação, atividade antifúngica e avaliação sinérgica de nitroestirenos *in vitro***. [s.l.] Universidade Federal do Pará - UFPA, 2014.

OLSZANSKI, A. J. Current and future roles of targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma. **Journal of managed care pharmacy: JMCP**, v. 20, n. 4, p. 346–56, 2014.

OTT, P. A.; HODI, F. S.; ROBERT, C. CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: New immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5300–5309, 2013.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–98, dez. 2012.

PADUA, R. A.; BARRASS, N.; CURRIE, G. A. A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line. **Nature**, v. 311, n. 5987, p. 671–3, jan. 1984.

PALMIERI, G. et al. Multiple Molecular Pathways in Melanomagenesis: Characterization of Therapeutic Targets. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. August, p. 1–16, 2015.

PARK, J.; PEI, D. trans-Beta-nitrostyrene derivatives as slow-binding inhibitors of protein tyrosine phosphatases. **Biochemistry**, v. 43, n. 47, p. 15014–21, 30 nov. 2004.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.

PETTIT, R. K. et al. E-Combretastatin and E-resveratrol structural modifications: antimicrobial and cancer cell growth inhibitory beta-E-nitrostyrenes. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 17, n. 18, p. 6606–12, 2009a.

PETTIT, R. K. et al. E-Combretastatin and E-resveratrol structural modifications: Antimicrobial and cancer cell growth inhibitory β -E-nitrostyrenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 18, p. 6606–6612, 15 set. 2009b.

PTEN GENE. **PTEN phosphatase and tensin homolog [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5728>>. Acesso em: 31 out. 2015.

RAHMANI-NEZHAD, S. et al. Synthesis, *in vitro* cytotoxicity and apoptosis inducing study of 2-aryl-3-nitro-2H-chromene derivatives as potent anti-breast cancer agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 86, p. 562–9, 2014a.

RAHMANI-NEZHAD, S. et al. Synthesis, *in vitro* cytotoxicity and apoptosis inducing study of 2-aryl-3-nitro-2H-chromene derivatives as potent anti-breast cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 562–569, 30 out. 2014b.

RAHN, C. A.; BOMBICK, D. W.; DOOLITTLE, D. J. Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity. **Fundamental and applied toxicology official journal of the Society of Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 435–48, maio 1991.

RAPP, U. R. et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 14, p. 4218–22, jul. 1983.

RASTOGI, R. P.; RICHA; SINHA, R. P. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. **EXCLI Journal**, v. 8, p. 155–181, 2009.

RAY, P. et al. Crocetin exploits p53-induced death domain (PIDD) and FAS-associated death domain (FADD) proteins to induce apoptosis in colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 6, p. 32979, 13 set. 2016.

RBN1 GENE. **RB1 retinoblastoma 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5925>>. Acesso em: 31 out. 2015.

REBECCA, V. W.; SONDAK, V. K.; SMALLEY, K. S. M. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. **Melanoma research**, v. 22, n. 2, p. 114–22, 2012.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 4, 2006.

RIGEL, D. S.; RUSSAK, J.; FRIEDMAN, R. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 60, n. 5, p. 301–316, 2010.

SEGURA, M. F. et al. MicroRNA and cutaneous melanoma: From discovery to prognosis and therapy. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 10, p. 1823–1832, 2012.

SENA, L.; CHANDEL, N. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen

species. **Molecular cell**, v. 48, n. 2, p. 158–167, 2012.

SHAN, C. et al. Design, Synthesis, and Evaluation of Isaindigotone Derivatives To Downregulate *c-myc* Transcription via Disrupting the Interaction of NM23-H2 with G-Quadruplex. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1292–1308, 23 fev. 2017.

SHEN, H. M.; LIU, Z. G. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 928–939, 2006.

SHENENBERGER, D. W. Cutaneous malignant melanoma: A primary care perspective. **American Family Physician**, v. 85, p. 161–168, 2012.

SHEPPARD, K. E.; MCARTHUR, G. A. The cell-cycle regulator CDK4: An emerging therapeutic target in melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5320–5328, 2013.

SHINOURA, N. et al. Adenovirus-mediated overexpression of Fas induces apoptosis of gliomas. **Cancer Gene Therapy**, v. 7, n. 2, p. 244–323, 2000.

SIM CHOI, H. et al. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 27, n. 1, p. 31–44, jan. 2006.

SKIN CANCER FOUNDATION. **Skin Cancer Facts**. Disponível em: <<http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/skin-cancer-facts>>. Acesso em: 27 out. 2015.

SONG, J. H. et al. fl -Asparaginase-mediated downregulation of c-Myc promotes 1,25(OH)₂D₃-induced myeloid differentiation in acute myeloid leukemia cells. **International Journal of Cancer**, 22 fev. 2017.

STEVENS, J. B. et al. Heterogeneity of cell death. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 139, n. 3, p. 164–173, 2013.

STEWART, R.; CLARK, R. H. Some new indicators derived from vanillin; 4-hydroxy-3-methoxy-beta-nitrostyrene and homologues. **Canadian journal of research**, v. 26, n. Sect B 1, p. 7–10, jan. 1948.

SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 21 fev. 2015.

SUI, X. et al. P38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. **Cancer Letters**, v. 344, n. 2, p. 174–179, 2014.

TANG, M.-S. Ultraviolet A light: potential underlying causes of melanoma. **Future oncology (London, England)**, v. 6, p. 1523–1526, 2010.

TIMOFEEVA, O. A. et al. Enhanced expression of SOS1 is detected in prostate cancer epithelial cells from African-American men. **International journal of oncology**,

v. 35, n. 4, p. 751–60, out. 2009.

TP53 GENE. **TP53 tumor protein p53 [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>>. Acesso em: 18 mar. 2015.

TRAXLER, P. M. et al. Sulfonylbenzoyl-nitrostyrenes: potential bisubstrate type inhibitors of the EGF-receptor tyrosine protein kinase. **Journal of medicinal chemistry**, v. 34, n. 8, p. 2328–37, ago. 1991.

TSAI, C.-H. et al. 3'-Hydroxy-4'-methoxy- β -methyl- β -nitrostyrene inhibits tumor growth through ROS generation and GSH depletion in lung cancer cells. **Life Sciences**, 19 dez. 2016.

TSAO, H. et al. Melanoma: From mutations to medicine. **Genes and Development**, v. 26, p. 1131–1155, 2012.

URTEAGA, O.; PACK, G. On the antiquity of melanoma. **Cancer**, v. 19, p. 607–610, 1966.

VALE, J. K. L. **Estudo do mecanismo do nitrofeniletano na prostaglandina-endoperóxido sintase e relação estrutura-propriedade de nitroderivados**. [s.l.] Universidade Federal do Pará - UFAM, 2011.

VARA, D.; PULA, G. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. **Current molecular medicine**, v. 14, n. 9, p. 1103–25, 2014.

VILLAR, J. A. F. P. et al. Synthesis and evaluation of nitrostyrene derivative compounds, new snake venom phospholipase A2 inhibitors. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1467–1478, 15 jun. 2008a.

VILLAR, J. A. F. P. et al. Synthesis and evaluation of nitrostyrene derivative compounds, new snake venom phospholipase A2 inhibitors. **Toxicon**, v. 51, p. 1467–1478, 2008b.

WANG, C. et al. Bifidobacterial recombinant thymidine kinase-ganciclovir gene therapy system induces FasL and TNFR2 mediated antitumor apoptosis in solid tumors. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 545, 27 dez. 2016a.

WANG, H.-J. et al. Silibinin induces the generation of nitric oxide in human breast cancer MCF-7 cells. **Free Radical Research**, v. 44, n. 5, p. 577–584, 7 jan. 2010.

WANG, J. et al. Suppression of KRas-mutant cancer through the combined inhibition of KRAS with PLK1 and ROCK. **Nature Communications**, v. 7, p. 11363, 19 maio 2016b.

WANG, W.-Y. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of novel beta-nitrostyrene derivatives as tyrosine kinase inhibitors with potent antiplatelet activity. **Biochemical pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 601–11, 15 ago. 2007a.

WANG, W.-Y.; WU, Y.-C.; WU, C.-C. Prevention of platelet glycoprotein IIb/IIIa

activation by 3,4-methylenedioxy-beta-nitrostyrene, a novel tyrosine kinase inhibitor. **Molecular pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 1380–9, out. 2006.

WANG, W. Y. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of novel β -nitrostyrene derivatives as tyrosine kinase inhibitors with potent antiplatelet activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, p. 601–611, 2007b.

WEI, C.-K. et al. Inhibition of the interactions between metastatic human breast cancer cells and platelets by β -nitrostyrene derivatives. **Life Sciences**, v. 143, p. 147–155, 15 dez. 2015.

WERNER, J. M.; EGER, K.; JÜRGEN STEINFELDER, H. Comparison of the rapid pro-apoptotic effect of trans-beta-nitrostyrenes with delayed apoptosis induced by the standard agent 5-fluorouracil in colon cancer cells. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 12, n. 1, p. 235–46, 2007.

WU, C.-C.; BRATTON, S. B. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 6, p. 546–58, 20 ago. 2013.

XU, W. et al. The role of nitric oxide in cancer. **Cell research**, v. 12, n. 5–6, p. 311–320, 2002.

YU, H. et al. Anti-Fas Antibody Conjugated Nanoparticles Enhancing the Antitumor Effect of Camptothecin by Activating the Fas–FasL Apoptotic Pathway. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 44, p. 29950–29959, 9 nov. 2016.

ZAIDI, M. R.; DAY, C.-P.; MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2381–91, out. 2008.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell research**, v. 15, n. 1, p. 11–18, 2005.

ZENG, Z. et al. Nitrostyrene Derivatives Act as RXR α Ligands to Inhibit TNF α Activation of NF- κ B. **Cancer research**, v. 75, n. 10, p. 2049–60, 15 maio 2015.

ZHENG, N. et al. Crosstalk of ROS/RNS and autophagy in silibinin-induced apoptosis of MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 38, n. 2, p. 277–289, 21 fev. 2017.

9 APÊNDICE

10 Curriculum Vitae Resumido

Graduada em Farmácia (2007) com Complemento de Habilitação em Análises Clínicas e Toxicológicas (2009) pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Mestre em Ciências Farmacêuticas (2012), doutoranda do Programa de Inovação Farmacêutica na UFAM. Possui experiência na execução de técnicas de Farmacologia pré-clínica *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, adquirida no Centro de Biotecnologia da Amazônia. Possui experiência em laboratório de cultura celular, tendo desenvolvido técnicas aplicadas à avaliação de segurança, eficácia e mecanismos de ação de substâncias com potenciais atividades biológicas no Biophar (UFAM) e no LETI (FIOCRUZ - Bahia). Atua em laboratório de análises clínicas desde 2001, estando atualmente vinculada ao Laboratório de Citologia Sebastião Marinho (SEMSA). Atua na docência desde 2009, tendo ministrado as disciplinas de Hematologia Clínica, Citologia Clínica, Trabalho de Conclusão de Curso, Práticas Farmacêuticas, Farmacologia Básica, Farmacologia Clínica, Estágio em Hematologia Clínica, Tópicos Especiais em Ciências Farmacêuticas, Farmacodinâmica, Atenção Farmacêutica e Farmacobotânica, na UFAM e Centro Universitário do Norte.

Publicações resultantes do projeto de doutorado:

Artigo a ser enviado para a revista Toxicology and Applied Pharmacology (aguardando o depósito de patente): Betanitroestiren induces ROS mediated apoptosis and inhibits tumor growth in melanoma models.

Solicitação de patente (em andamento): Composto (7E), seus derivados e composições anti-tumorais

Apresentações em congresso

Barbosa, G. S.; Uratani, M. H.; Lima, E. S.; Carneiro, P. F.; Ferreira, V. F.; Vasconcellos, M. C. Xanthenes Derivatives: cytotoxicity and photosensitizer effects. In: 10 th International Gastric Cancer Congress, 2015, São Paulo.

Barbosa, G. S.; Gregório, L.; Lemos, T. L. G.; Burbano, R.; Montenegro, R. C.; Vasconcellos, M. C.; Gregório, L. Biflorin induces human gastric cancer cells redifferentiation. In: 10 th International Gastric Cancer Congress, 2015, São Paulo.

Ralph, A. C. L.; Vasconcellos, M. C.; Souza, L. G. S.; Lemos, T. L. G.; Barbosa, Gleyce dos Santos. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of biflorin in human lymphocytes. In: 1st Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2014, Porto Alegre.

Barbosa, Gleyce; Vasconcellos, M. C.; Ralph, A. C. L.; Souza, Luciana G.S.; Burbano, Rommel M.R. Anticancer activity of biflorin on gastric cancer cell line In: 10 th International Gastric Cancer Congress, 2013, Verona.

Versiani, F. O. L.; Ralph, A. C. L.; Barbosa Gleyce; Maranhao, R. C.; Vasconcellos, M. C. Cytotoxicity *in vitro* of paclitaxel nanoemulsion in normal cells and gastric cancer cell. In: 8^o International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2011, Ribeirão Preto.

Almeida, S. B. D.; Barbosa Gleyce; Soares, B. M.; Branco, D. F.; Santos, N. F.; Seabra, A. D.; Araujo, T. M.; Burbabo, R. R. ; Ferreira, V.F. ; Nogueira, A. F. ; Azevedo,; Vasconcellos, M. C. New benzothiazoles induces cell death. In: XXVI Reunião Anual da FESBE, 2011, Rio de Janeiro.

Magalhaes, A.; Barbosa Gleyce; F., Liziara; Garcia, N. P.; Malheiro, A.; Santos, M. C. Cellular migration and release of IL-6 induced by the action of *Bothrops atrox* venom and inhibited by the plant species *Marsypianthes chamaedrys* (VAHL) KUNTZ. In: 10th Meeting of the PanAmerican Section of the International Society on Toxinology, 2010, San José.

Artigos publicados

Carneiro, Paula F. ; Pinto, Maria C.R.F. ; Marra, Roberta K.F. ; Da Silva, Fernando De C. ; Resende, Jackson A.L.C. ; Rocha E Silva, Luiz F. ; Alves, Hilkem G. ; Barbosa, Gleyce S. ; De Vasconcellos, Marne C. ; Lima, Emerson S. ; Pohlit, Adrian M. ; Ferreira, Vitor F. . Synthesis and antimalarial activity of quinones and structurally-related oxirane derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 108, p. 134-140, 2016.

de Bari, Cristiane Coelho ; Sampaio, Fábio ; Conde, Nikeila ; Moura, Luanny ; Júnior, Valdir Veiga ; Barbosa, Gleyce ; Vasconcellos, Marne ; Toda, Carina ; Venâncio, Gisely ; Bandeira, Maria Fulgência . Amazon emulsions as cavity cleansers: antibacterial activity, cytotoxicity and changes in human tooth color. Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 26, p. 497-501, 2016

Verdam, Maria Christina S. ; Guilhon-Simplicio, Fernanda ; Barbosa, Gleyce S. ; Magalhães, Alcineide L. ; Oliveira, Cinthya I.F.B. ; Almeida, Patrícia D.O. ; Machado,

Tallita M. ; Vasconcellos, Marne C. ; Lima, Emerson S. ; Ohana, Débora T. ; Pereira, Maria M. . Anti-inflammatory action of *Justicia acuminatissima* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Impresso)*, v. 25, p. 264-268, 2015.

Oliveira, A. B. ; Barbosa Gleyce ; Verdam, M. C. S. ; Ohana, D. ; Mendonca, M. S. ; Meira, R. M. S. A. . Efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de trevo-roxo (*Scutellaria agrestis* A. St.-Hil. ex Benth. - Lamiaceae) em roedores. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (Impresso)*, v. 16, p. 174-181, 2014.

Montenegro, Raquel Carvalho ; de Vasconcellos, Marne Carvalho ; Barbosa, Gleyce dos Santos ; Burbano, Rommel M.R. ; Souza, Luciana ; Lemos, Telma; Costa-Lotufo, Letícia; de Moraes, Manoel Odorico. A novel o-naphthoquinone inhibits N-cadherin expression and blocks melanoma cell invasion via AKT signaling. *Toxicology in vitro*, v. 27, p. 2076-2083, 2013.

Guilhon-Simplicio, Fernanda ; Lima, Emerson Silva ; Pereira, Maria de Meneses; Barbosa, Gleyce dos Santos ; Conrado, Gabrielly Galdino ; Pinheiro, Carlos Cleomir de Souza ; Santos, Pierre Alexandre dos . Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 140, p. 282-286, 2012.

Vasconcelos, Z. ; Barbosa, Gleyce ; Pedrosa, T. N. ; Pinheiro Junior, M. N. . "Prevalência do vírus da Hepatite B nos pacientes atendidos em um hospital de referência da cidade de Manaus - AM no ano de 2009". *Revista Científica Literatus*, v. 5, p. 42-47, 2011.

Magalhães, Alcineide ; Barbosa, Gleyce ; Verdam, Maria Christina dos Santos ; Fraporti, Liziara ; Malheiro, Adriana ; Lima, Emerson Silva ; Dos-Santos, Maria Cristina . Inhibition of the inflammatory and coagulant action of *Bothrops atrox* venom by the plant species *Marsypianthes chamaedrys*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 134, p. 82-88, 2011.

11 ANEXOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: **001/2013**

PROJETO: "Produtos naturais e sintéticos bioativos: Potencial biotecnológico no tratamento do câncer"

COORDENADOR: Dr. Daniel Pereira Bezerra

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongos C57BL6	400

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 17/04/2013, e tem validade até 17/04/2015.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 04/17/2013, being valid until 04/17/2015.

Salvador, 17 de abril de 2013.

PATRICIA SAMPAIO T. VERAS

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

12



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 006/2015

PROJETO: "Produtos naturais e sintéticos bioativos: Potencial biotecnológico no tratamento do câncer"

COORDENADOR: Dr. Daniel Pereira Bezerra

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongos CB17 SCID	1.680

Certificamos que na presente versão este projeto, está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 02/09/2015, e tem validade até 02/09/2017.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 09/02/2015, being valid until 09/02/2017.

Salvador, 02 de setembro de 2015.

DEBORAH BITTENCOURT MOTHÉ FRAGA

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ