



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

RENATA VIRGÍNIA CAVALCANTI SANTOS

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* DE METÁSTASE
CEREBRAL DE MELANOMA PARA O ESTUDO DO NICHOS PRÉ-
METASTÁTICO E DE NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS
CONTRA O MELANOMA**

Recife

2019

RENATA VIRGÍNIA CAVALCANTI SANTOS

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* DE METÁSTASE
CEREBRAL DE MELANOMA PARA O ESTUDO DO NICHOS PRÉ-
METASTÁTICO E DE NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS CONTRA O
MELANOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica, no Centro de Biociências,
Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de doutorado.
Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Co-orientadora: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Santos, Renata Virginia Cavalcanti

Estabelecimento de um modelo *in vitro* de metástase cerebral de melanoma para o estudo do nicho pré-metastático e de novas abordagens terapêuticas contra o melanoma /Renata Virginia Cavalcanti Santos. – 2019.

116 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Michelly Cristiny Pereira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação terapêutica, 2019. Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Pele – Câncer. 2. Melanoma. 3. Câncer – Tratamento. I. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (orientador). II. Pereira, Michelly Cristiny (coorientadora). III. Título.

614.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 – 149

RENATA VIRGÍNIA CAVALCANTI SANTOS

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO *IN VITRO* DE METÁSTASE
CEREBRAL DE MELANOMA PARA O ESTUDO DO NICHOS PRÉ-
METASTÁTICO E DE NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS CONTRA O
MELANOMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica, no Centro de Biociências,
Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de doutorado.

Aprovada em: 21/03/2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Luiz Alberto Reis Mattos Junior
Universidade Federal de Pernambuco

A Deus, sempre.

A meus pais, que em espírito e presença sempre me apoiaram e me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, toda força e amor com que Ele sempre me abençoou. Aos meus pais, por sempre terem me guiado por princípios e valores que construíram os meus pilares de vida. Aos meus familiares, pelo apoio, amor e carinho com que sempre me acolheram e me incentivaram a lutar pelos meus sonhos.

Agradeço especialmente ao Professor Moacyr, por acreditar no meu potencial, me dar oportunidades de crescimento e ser um exemplo de profissional, amigo e mestre aos que o rodeiam, pelo amor à docência e à ciência. À Professora Michelly, sempre atenciosa e à disposição, também como amiga e mestre, pelo exemplo de responsabilidade com a ciência e com a sociedade. Aos dois, muito obrigada por todo carinho!

Ao Professor Roger Chammas, pela oportunidade, confiança e atenção com que me recebeu em seu laboratório no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), além do exemplo de docente e pesquisador com que lida com a ciência no seu dia a dia dentro da Faculdade de Medicina. À Silvina Bustos, pela paciência, carinho e disponibilidade com que me recebeu, despertando uma amizade em meio a experiência científica e profissional. A todos do Laboratório da Oncologia Experimental, especialmente à Renata Saito, Tharcisio, Renata Vasconcelos, Luciana, Cris, Mauro, Ana Carol, Mayara, Helen, Mara e Jânio, além dos demais funcionários, que sempre foram presentes e atenciosos quando precisei de ajuda.

À Professora Belmira, minha primeira orientadora e grande mestre científica, com quem aprendi especialmente a dedicação e a responsabilidade que você deve dar à atividade que se propôs a fazer e o amor à ciência.

A Paulo Brito, secretário do PPGIT, profissional de referência para qualquer professor e aluno deste programa de pós-graduação, sempre solícito e empenhado em resolver e ajudar no decorrer desses quatro anos de doutorado.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (Linat), representados por Pablo Gualberto, o qual se fez tão importante num dos momentos mais conflituosos da minha vida acadêmica e que, se não fosse pelo seu apoio, incentivo e confiança, eu não teria vivido este projeto de doutorado e todas as oportunidades que vieram com ele. Aos amigos do Linat, com quem aprendi novas relações de amizade e trabalho e com quem tenho firmado parcerias e experiências que só acrescentam profissional e pessoalmente. À Clara, companheira diária no “Team Metástase”, com quem dividi as angústias e alegrias no desenvolvimento deste projeto.

Aos amigos de fora da vida acadêmica e científica, mas sempre presentes no meu crescimento pessoal e profissional. Aos que estão perto e aos que estão longe, por toda paciência, carinho e força no dia a dia. A Marcelo, que conseguiu mesmo à distância ser presente diariamente na minha vida, participando de todos os momentos dos últimos três anos deste doutorado. Aos amigos de dentro da vida científica, pelo compartilhamento da rotina, desde as dificuldades até as pequenas e grandes conquistas.

À banca examinadora, pela atenção e responsabilidade com que se dispôs a contribuir com esse trabalho, numa etapa tão importante da vida acadêmica de um pós-graduando, meu muito obrigada.

À CAPES/CNPq e FACEPE, pelo apoio financeiro essencial para a realização deste trabalho.

Muito obrigada.

RESUMO

O melanoma maligno é um tumor de baixa incidência, mas de alta letalidade entre os pacientes, especialmente por suas características agressividade e capacidade metastática. A metástase cerebral, apesar de não estar entre as mais diagnosticadas, está presente em 70% das autópsias de melanoma. O melanoma é significativamente resistente aos tratamentos existentes na clínica, resultando em altos índices de recidivas. A busca por novas abordagens terapêuticas, bem como o desenvolvimento de um modelo *in vitro* para o estudo da metástase cerebral de melanoma, foram os objetivos propostos por esse trabalho. A importância do microambiente foi validada pela modulação diferencial que as células cerebrais corticais mistas e os astrócitos isolados promoveram no perfil de expressão dos fatores de transcrição (MITF e BRN2) controladores do processo metastático, em três linhagens de melanoma. Enquanto os astrócitos foram responsáveis pela redução do MITF, as células mistas aumentaram a expressão do BRN2, o qual é um dos principais reguladores da expressão do MITF. Por outro lado, fatores solúveis astrocitários induziram significativamente processos como proliferação e migração tumoral nas três linhagens de melanoma, mais do que as células mistas, também seletivamente. Em paralelo, o derivado imidazacridínico AC05 foi citotóxico contra a linhagem UACC62 ($IC_{50} = 28,29 \pm 0,6\mu M$), *in vitro*, além de induzir a expressão de supressores tumorais, como PAR-4 e BID. Em um modelo de xenoinxerto, o AC05 promoveu uma redução significativa de 82% no peso tumoral e de 55% no volume tumoral, gerando ainda a formação de áreas de morte celular. O tratamento com AC05 no modelo de metástase cerebral de melanoma ainda mostrou a redução de marcador proliferativo KI67 e translocação do supressor tumoral PAR-4 dentro da célula de melanoma para sua forma ativa. Assim, mostrou-se o desenvolvimento de um novo derivado imidazacridínico com promissora atividade antitumoral, bem como um modelo para o estudo do fenômeno da metástase cerebral de melanoma *in vitro* como nova ferramenta terapêutica.

Palavras-chave: BRN2. Câncer de pele. Imidazacridinas. Inovação terapêutica. MITF.

ABSTRACT

Malignant melanoma is a low incidence, but highly lethal tumor, among patients, especially because of its aggressiveness and metastatic capacity. Brain metastases, although not among the most diagnosed, it is present in 70% of melanoma autopsies. Melanoma is significantly resistant to the existing treatments in the clinic, resulting in high relapse levels. The search for new therapeutic approaches, as well as the development of an *in vitro* model for the study of melanoma brain metastasis, were the goals proposed by this work. The importance of the microenvironment was validated by the differential modulation that mixed cortical brain cells and isolated astrocytes promoted in the expression profile of the transcription factors (MITF and BRN2) controlling the metastatic process in three melanoma lineages. While astrocytes were responsible for the reduction of MITF, mixed cells increased the expression of BRN2, which is one of the major regulators of MITF expression. On the other hand, astrocytic soluble factors significantly induced processes such as tumor proliferation and migration in the three melanoma lineages, more than mixed cells did, also selectively. In parallel, the AC05 imidazacridine derivative was cytotoxic against UACC62 ($IC_{50} = 28,29 \pm 0,6\mu M$), *in vitro*, in addition to enhancing the expression of tumor suppressors, such as PAR-4 and BID, preliminarily. Furthermore, in a xenograft model, AC05 promoted a significant reduction of 82% in tumor weight and 55% in tumor volume, also generating the formation of cell death areas. AC05 treatment in the melanoma brain metastasis model still showed a decrease of KI67 proliferative marker and cellular translocation of PAR-4 tumor suppressor within the melanoma cell to its active form. Therefore, the development of a new imidazacridine derivative with promising antineoplastic activity was demonstrated, as well as a model for the study of the phenomenon of melanoma brain metastasis *in vitro* as a new therapeutic tool.

Keywords: BRN2. Skin cancer. Imidazacridines. Therapeutic innovation. MITF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Principais componentes celulares da epiderme e da derme.....	23
Figura 2 –	Estimativas Globocan, 2018	24
Figura 3 –	Estimativas INCA, 2018	26
Figura 4 –	Estimativas INCA para o Estado de Pernambuco, 2018	26
Figura 5 –	Modelo de transformação de melanócitos em células de melanoma devido a alterações genômicas	28
Figura 6 –	Alterações moleculares decorrentes de alterações genéticas e epigenéticas	31
Figura 7 –	Alterações fenotípicas do melanoma reguladas pelo eixo BRN2-MITF	35
Figura 8 –	Principais passos e fatores no estabelecimento da metástase cerebral do melanoma	37
Figura 9 –	Esquematização de diferentes métodos para o estudo <i>in vitro</i> da metástase	40
Figura 10 –	Estrutura das imidazolidinas e acridinas	45
Figura 11 –	Linhagens tumorais de melanoma e pâncreas cultivadas em meio completo com SFB a 10% em contraste de fase	46
Figura 12 –	Desenho experimental do ensaio de co-cultura	49
Figura 13 –	Desenho experimental do ensaio do meio condicionado	51
Figura 14 –	Derivado imidazacridínico desenvolvido pelo LPSF	53
Figura 15 –	Fluxograma metodológico	57
Figura 16 –	Viabilidade (V) celular por MTT das culturas tumorais e primária mista em diferentes concentrações de SFB (%), comparada à condição de SFB a 10% (V=100%)	58
Figura 17 –	Expressão dos marcadores celulares β -Tubulina III e GFAP pelas linhagens tumorais	59
Figura 18 –	Expressão do marcador celular MITF específico de melanoma e Faloidina, marcando filamentos de F-actina no citoesqueleto.	59
Figura 19 –	Expressão do marcador celular BRN2 específico de melanoma e Faloidina, marcando filamentos de F-actina no citoesqueleto.	60
Figura 20 –	Expressão do marcador proliferativo KI67 pelas quatro linhagens tumorais	61
Figura 21 –	Caracterização da cultura primária mista	62
Figura 22 –	Caracterização da cultura de astrócitos isolados	63

Figura 23 –	Expressão dos marcadores citoplasmáticos β -Tubulina III e GFAP pelas linhagens tumorais e pelas células cerebrais mistas	64
Figura 24 –	Número de células de melanoma MITF+ em porcentagem	65
Figura 25 –	Número de células de melanoma BRN2+ em porcentagem	66
Figura 26 –	Expressão dos marcadores citoplasmáticos β -Tubulina III e GFAP, pelas linhagens tumorais e pelos astrócitos, respectivamente	67
Figura 27 –	Número de células de melanoma MITF+ em porcentagem	68
Figura 28 –	Número de células de melanoma BRN2+ em porcentagem	68
Figura 29 –	Expressão do fator de transcrição MITF pelos astrócitos quando expostos ao meio condicionado das linhagens de melanoma	70
Figura 30 –	Número de células de melanoma MITF+ e BRN2+ em porcentagem, após exposição ao meio condicionado de células mistas (a-c) e (g-h) e de astrócitos isolados (d-f) e (j-m)	72
Figura 31 –	Efeito da exposição ao meio condicionado de células mistas na proliferação celular tumoral	74
Figura 32 –	Efeito da exposição ao meio condicionado de astrócitos na proliferação celular tumoral	74
Figura 33 –	Efeito da exposição ao meio condicionado de células mistas e de astrócitos na migração celular tumoral	75
Figura 34 –	Efeito do tratamento de AC05 sobre a viabilidade celular durante 24 e 48 horas	77
Figura 35 –	Expressão protéica após tratamento na UACC62 com AC05 por 48 horas	78
Figura 36 –	Resultados da atividade antitumoral do AC05 <i>in vivo</i>	78
Figura 37 –	Imunohistoquímica Hematoxilina-Eosina nos tumores retirados dos animais	79
Figura 38 –	Expressão de KI67 pelas células UACC62 em co-culturas cerebrais tratadas e não tratadas com o AC05 (28 μ M)	80
Figura 39 –	Expressão de PAR-4 pelas células UACC62 em co-culturas cerebrais tratadas e não tratadas com o AC05 (28 μ M)	81
Figura 40 –	Imagem representativa da conclusão	97
Figura 41 –	Fluxograma das perspectivas	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt	Proteína Quinase B
APC	<i>Adenomatous polyposis C</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
BCA	Ácido bincinconínico
Bcl-2	<i>B-cell Lymphoma 2</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BHE	Barreira hemato-encefálica
BID	<i>BH3 Interacting-domain death agonist</i>
BOLD	Bleomicina, Vincristina, Lomustina e Dacarbazina
BRN2	<i>Brain-2</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Co-cultura
CCL2	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i>
CDH	<i>Cadherin genes</i>
CDKN	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CMC	Carboximetilcelulose
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Conitec	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4</i>
CTR	Controle
CVD	Cisplatina, Vinblastina e Dacarbazina
Cx	Conexinas
CXCL8	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8</i>
DAC	Dacarbazina
DAPI	<i>4',6'-diaminido-2-phenylindole</i>
Dartmouth	Dacarbazina, Cisplatina, Carmustina e Tamoxifeno
div	Dias <i>in vitro</i>

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDNRB	Receptor de endotelina tipo-B
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FasL	Fas Ligante
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fator básico de crescimento de fibroblastos
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo
HE	Hematoxilina-Eosina
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
INF- α	Interferon- α
INF- γ	Interferon gamma
IL-2	Interleucina-2
IL-23	Interleucina-23
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPI	Ipilimumab
IS	Índice de Seletividade
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
KRAS	Kirsten RAS
MAGE	<i>Melanoma-associated antigen</i>
MMP	Metaloproteinases de Matriz Extracelular
MC	Meio condicionado
MITF	<i>Microphthalmia-induced transcription factor</i>
MGMT	<i>O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase</i>
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
MTT	3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
MTA2	<i>Metastasis Associated 1 Family Member 2</i>
MTAP	<i>Methylthioadenosine Phosphorylase</i>
NFIB	<i>Nuclear Factor 1B</i>
NGF	<i>Neural growth factor</i>

PAR-4	<i>Prostate apoptosis response-4</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCDT	Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RASSF	<i>Ras association family</i>
RGP	<i>Radial growth progression</i>
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
TA	Temperatura ambiente
TBST	<i>Tris-buffered saline</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
UV	Ultravioleta
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VGP	<i>Vertical growth progression</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	Objetivo Geral	19
1.1.2	Objetivos Específicos	19
1.2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	MELANOMA	23
2.1.1	Epidemiologia do melanoma	24
2.1.2	Fisiopatologia do melanoma	27
2.1.3	Progressão do melanoma	29
2.2	METÁSTASE	31
2.2.1	Metástase cerebral de melanoma	35
2.2.1.1	Astrócitos	37
2.3	MODELOS PARA O ESTUDO DO CÂNCER	38
2.4	TRATAMENTOS DO MELANOMA MALIGNO	41
2.5	NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA: O DERIVADO IMIDAZACRIDÍNICO AC05	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1	CULTIVO DAS LINHAGENS TUMORAIS IN VITRO	51
3.2	ESTABELECIMENTO DO MODELO DE METÁSTASE CEREBRAL DE MELANOMA IN VITRO	52
3.2.1	Animais	52
3.2.2	Culturas de células cerebrais primárias corticais mistas	52
3.2.3	Isolamento dos astrócitos corticais	53
3.2.4	Estabelecimento dos parâmetros experimentais	53

3.2.5	Co-cultura das linhagens tumorais sobre as células primárias cerebrais corticais mistas ou astrocitárias	54
3.2.6	Ensaio do meio condicionado de células de melanoma sobre células primárias cerebrais corticais mistas ou astrocitárias	55
3.2.7	Ensaio do meio condicionado de células primárias cerebrais corticais mistas ou de astrócitos sobre as linhagens tumorais	55
3.2.8	Imunofluorescência	56
3.2.9	Contagem de células MITF+ e BRN2+	57
3.2.10	Proliferação celular das linhagens tumorais com meio condicionado de células primárias	57
3.2.11	Migração celular das linhagens tumorais com meio condicionado de células primárias	58
3.3	DERIVADO IMIDAZACRIDÍNICO AC05	58
3.3.1	Avaliação da citotoxicidade do composto por MTT	59
3.3.2	Extração de proteínas e Western blotting	59
3.3.3	Avaliação da atividade antineoplásica in vivo	60
3.3.3.1	Imuno-histoquímica de hematoxilina-eosina (HE) nos tumores de melanoma tratados in vivo	60
3.4	TRATAMENTO DA CO-CULTURA DE MELANOMA SOBRE CÉLULAS CEREBRAIS IN VITRO	61
3.5	ASPECTOS ÉTICOS	61
3.6	FLUXOGRAMA METODOLÓGICO	61
4	RESULTADOS	63
4.1	ESTABELECIMENTO DO MODELO DE METÁSTASE CEREBRAL DE MELANOMA IN VITRO	64
4.1.1	Viabilidade celular nos parâmetros experimentais estabelecidos	64
4.1.2	Caracterização das linhagens de melanoma em relação aos marcadores celulares	64
4.1.3	Caracterização do microambiente cerebral como nicho pré-metastático	67

4.1.3.1	Marcadores celulares da cultura primária mista	67
4.1.3.2	Marcadores celulares dos astrócitos isolados	68
4.1.4	Co-culturas de linhagens tumorais sobre a cultura primária	68
4.1.4.1	Co-cultura das linhagens tumorais sobre as células cerebrais mistas	69
4.1.4.1.1	<i>Expressão de MITF e BRN2</i>	71
4.1.4.2	Co-cultura das linhagens tumorais sobre os astrócitos isolados	72
4.1.4.2.1	<i>Expressão de MITF e BRN2</i>	72
4.1.5	Efeito do meio condicionado dos melanomas sobre as culturas primárias	74
4.1.5.1	Expressão de MITF e BRN2	74
4.1.5.2	Proliferação das culturas primárias	75
4.1.6	Efeito do meio condicionado das culturas primárias sobre as linhagens tumorais	75
4.1.6.1	Expressão de MITF e BRN2	75
4.1.6.2	Proliferação das linhagens tumorais	79
4.1.6.3	Migração das linhagens tumorais	81
4.2	INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA O MELANOMA E CONTRA O MODELO DE METÁSTASE CEREBRAL DE MELANOMA	83
4.2.1	Avaliação da potencial atividade antineoplásica do derivado imidazacridínico AC05 frente às linhagens de melanoma	83
4.2.1.1	Avaliação da citotoxicidade do AC05 in vitro	83
4.2.1.1.1	<i>Efeito do AC05 na expressão protéica de supressores tumorais</i>	83
4.2.1.2	Avaliação da atividade antitumoral do AC05 in vivo	84
4.2.1.2.1	<i>Efeito do AC05 frente à linhagem UACC62</i>	85
4.2.2	Avaliação da atividade antitumoral do AC05 no modelo de metástase cerebral de melanoma in vitro	85
5	DISCUSSÃO	88

6	CONCLUSÃO	100
7	PERSPECTIVAS	103
	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO SOBRE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPOSTOS INDÓLICOS	122
	APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO SOBRE O PAPEL DAS MODIFICAÇÕES GLICOBIOLOGICAS NO CONTEXTO DA HIPÓXIA	123
	APÊNDICE C – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO SOBRE O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO PAR-4 NO TRATAMENTO TUMORAL	124
	APÊNDICE D – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO “ABORDAGENS TERAPÊUTICAS NO TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO CÂNCER”	125
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DOS ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	126
	ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	128

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento da população mundial, aliado a diversos fatores de riscos como má alimentação, tabagismo, sedentarismo, excesso de peso e aumento da exposição à luz ultravioleta, têm ocasionado o aumento da incidência de doenças crônicas (COCKERHAM; HAMBY; OATES, 2017; TU et al., 2018). Dentre tais doenças, o câncer se destaca pela alta mortalidade e redução da qualidade de vida dos pacientes, especialmente nos países menos desenvolvidos, devido ao menor acesso a diagnósticos em tempo hábil e prevalência de tratamentos pouco eficientes, com baixa seletividade e alta incidência de efeitos colaterais (MACHIELA; CHANOCK, 2017).

O tumor primário pode ser definido como a massa tumoral presente no sítio inicial, onde alterações genéticas e/ou epigenéticas promovem a conversão de células normais em cancerígenas, as quais se caracterizam principalmente pela desordem dos processos de proliferação e crescimento (DE GROOT et al., 2017; JOYCE; POLLARD, 2009; SCENEAY; SMYTH; MÖLLER, 2013). Com a progressão do tumor no sítio primário, as células mais agressivas, com fenótipo metastático, se responsabilizam pela disseminação e invasão para outros tecidos.

A busca pelo órgão secundário ainda não é completamente entendida, mas os estudos e resultados das últimas décadas são baseados na Teoria “*Seed and Soil*”, proposta por Stephen Paget em 1889 (RIBATTI; MANGIALARDI; VACCA, 2006). Segundo Paget, o tumor primário tem órgãos secundários pré-escolhidos de acordo com características moleculares e celulares específicas, onde o principal regulador do processo metastático é o microambiente (AMELOT et al., 2017; STEPHEN, 1889). Dessa forma, a preparação do nicho pré-metastático para a chegada das células tumorais, através da secreção de fatores reguladores, faz-se essencial para que o estabelecimento da metástase ocorra com sucesso (DE GROOT et al., 2017; SCENEAY; SMYTH; MÖLLER, 2013; SLEEMAN, 2012).

A metástase cerebral ocorre em aproximadamente 20 a 40% dos pacientes diagnosticados com câncer (SEOANE; DE MATTOS-ARRUDA, 2014) e os tumores primários que mais evoluem para metástase cerebral são os pulmonares, mamários e melanomas, em ordem de maior incidência respectivamente, seguidos ainda dos linfomas, dos gastrintestinais e dos tumores de próstata (CAGNEY et al., 2017; HANIBUCHI et al., 2014). O controle da metástase cerebral é um grande desafio clínico devido a sua associação a baixos prognósticos e prejuízos neurológicos, além do reduzido tempo de sobrevida para os paciente (JANDIAL, 2017; STELZER, 2013).

Dentre os tumores primários que metastizam no cérebro, o melanoma é um dos mais agressivos. Apesar de apresentar baixa incidência como tumor primário e a metástase cerebral ser diagnosticada em cerca de 45% dos casos, nas autópsias cerca de 70% dos pacientes apresentam metástase no cérebro (WESTPHAL; OLIVA; NIESSNER, 2017). A alta heterogeneidade celular do melanoma, até mesmo intratumoral, se reflete diretamente nos frequentes casos de recidiva, na resistência à terapêutica disponível, na seleção das células mais resistentes na progressão metastática e, conseqüentemente, em altos índices de letalidade. (DRE, 2014; KIRCHER et al., 2016).

Entende-se então que a busca por novas abordagens terapêuticas para o tratamento do melanoma deve ser paralela a estudos para um maior entendimento do comportamento agressivo desse tumor. Estudos recentes com derivados de tiazolidinas e imidazacridinas têm sido apresentados como bastante promissores no contexto da atividade antineoplásica contra linhagens de câncer de mama, o que despertou o interesse sobre seu efeito contra o melanoma, dado o nicho pré-metastático e a agressividade em comum entre ambos os tumores (BARROS et al., 2012; DA ROCHA PITTA et al., 2013; LAFAYETTE et al., 2013).

A conseqüente progressão de metástase do melanoma para o cérebro precisa ser igualmente estudada, a fim de se compreender quais interações diretas e/ou indiretas regem o estabelecimento deste processo e, que possam assim, ser utilizadas como ferramentas terapêuticas e de diagnóstico. O desenvolvimento de um modelo *in vitro* de metástase cerebral de melanoma poderia auxiliar as pesquisas de forma controlada e reprodutível para o adequado estudo deste tema tão complexo, seja no âmbito do estabelecimento da metástase em si, seja na constante busca por tratamentos mais eficazes, sendo este então o propósito do presente estudo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estabelecer um modelo *in vitro* para o estudo do microambiente do nicho pré-metastático e da metástase cerebral de melanoma e investigar a atividade antitumoral do derivado imidazacridínico AC05 contra o melanoma.

1.1.2 Objetivos Específicos

➤ Caracterizar o microambiente do cérebro como nicho pré-metastático do melanoma em uma cultura de células cerebrais corticais mista, em relação aos seus componentes celulares e expressão de supressores tumorais;

- Caracterizar o microambiente metastático frente às interações intercelulares diretas entre células de melanoma e células cerebrais mistas ou astrócitos isolados, através de marcadores específicos;
- Analisar os efeitos de fatores solúveis oriundos de melanoma maligno sobre o nicho pré-metastático e sobre astrócitos isolados, em relação à capacidade proliferativa dessas células e à expressão de fatores de transcrição de melanoma;
- Analisar os efeitos de fatores solúveis oriundos do nicho pré-metastático cerebral sobre a proliferação e migração de células de melanoma maligno, bem como sobre a expressão de marcadores celulares;
- Analisar a atividade anti-tumoral do derivado imidazacridínico AC05 frente a linhagens de melanoma maligno *in vitro* e *in vivo*;
- Analisar o efeito *in vitro* do AC05 no modelo de metástase cerebral de melanoma.

1.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Os dados epidemiológicos mostram que apesar do melanoma não estar entre os tipos de tumores mais incidentes, o mesmo é responsável por altos índices de mortalidade dada sua intrínseca agressividade e resistência terapêutica. Paralelamente às recidivas pela não eficiência dos tratamentos disponíveis, a metástase se estabelece progressivamente, reduzindo cada vez mais as chances de sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes. A metástase cerebral, por sua vez, apesar de também não pertencer aos altos índices estatísticos, tem seu diagnóstico muitas vezes não consolidado ou não reage mais a nenhum tratamento, mesmo entre os mais modernos.

A necessidade da constante busca por novas abordagens terapêuticas de forma a minimizar os efeitos colaterais existentes atualmente, garantindo uma melhor qualidade de vida aos pacientes, bem como reduzir o avanço da agressividade dos tumores e o estabelecimento do processo metastático estão entre os problemas mais urgentes a serem resolvidos na questão do câncer. Mas para se desenvolver novas terapias é necessário entender como cada processo metastático se desenvolve, quais as principais interações celulares e moleculares ocorrem e como podem ser utilizadas em favor do tratamento.

O papel dos astrócitos no estabelecimento da metástase cerebral tem sido estudado de forma majoritariamente isolada. Entretanto, entende-se que a influência do microambiente para a progressão e invasão tumoral deve ser estudada em conjunto, posto que os resultados

encontrados em estudos de interações com isolamento de células podem não refletir o que ocorre no ambiente onde todas as células estão presentes e convivendo e dependendo de inúmeras outras interações paralelas.

Diante de dois problemas de tanta importância, o presente trabalho tem como hipótese que o estabelecimento do modelo *in vitro* aqui proposto para o estudo da metástase cerebral de melanoma é capaz de mimetizar as interações celulares de forma mais real do que modelos que utilizam células isoladas, onde não é possível analisar o efeito do microambiente como um todo. Ao mesmo tempo em que também se acredita que o derivado imidazacridínico AC05 tem potencial de atividade antitumoral contra linhagens de melanoma, *in vitro* e *in vivo*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MELANOMA

O câncer de pele é um dos tumores mais frequentes na população brasileira e possui dois tipos de apresentação, o melanoma e o não-melanoma. Este último se subdivide em outros dois subgrupos, o carcinoma de células basais e o carcinoma de células escamosas. O melanoma, por sua vez, é uma neoplasia maligna, com origem em células embrionárias, a partir da transformação de melanócitos (INGRAFFEA, 2013; JAIMES; MARGHOOB, 2013).

Embora o câncer de pele se apresente como o mais frequente no Brasil, o melanoma tem baixa incidência, especialmente quando comparado com tumores como próstata e mama (INCA, 2017). Entretanto, sua baixa incidência não ofusca suas altas taxas de letalidade, devido à agressividade das suas células metastáticas e sua alta resistência à terapêutica disponível, com frequentes recidivas (INCA, 2017).

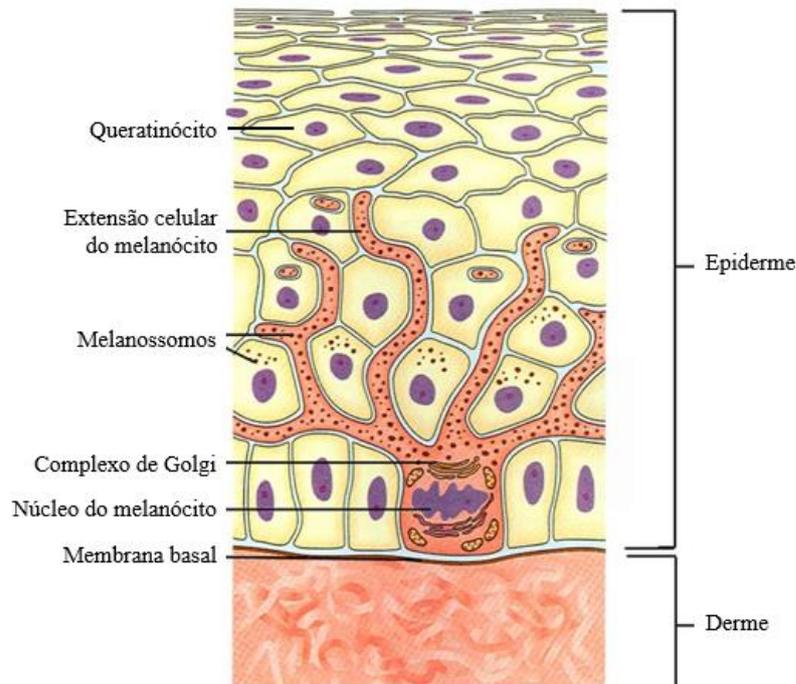
A pele apresenta como uma de suas principais funções a de ser a primeira frente de defesa do organismo (LIN; FISHER, 2007). Assim, a primeira camada é formada essencialmente por uma rede de queratinócitos, células que compõem o epitélio estratificado pavimentoso, responsáveis pela produção da queratina para as unhas e cabelos, e que estão diretamente interconectadas com os melanócitos e as células inflamatórias (ELSHOLZ et al., 2014). São os queratinócitos que controlam o crescimento e desenvolvimento dos melanócitos no microambiente da pele, tanto através de interações intercelulares (HAASS; HERLYN, 2005), como por sinalização parácrina (HAASS; HERLYN, 2005; HACHIYA et al., 2004; MOREIRAS et al., 2019).

Os melanócitos, por sua vez, são responsáveis pela produção de um pigmento protéico marrom-escuro, a melanina (LIN; FISHER, 2007). Esta proteína é produzida e armazenada em grânulos denominados melanossomos, vesículas especiais parecidas com lisossomos e produzidas pelo Complexo de Golgi (RAPOSO; MARKS, 2007). Quando os melanossomos ficam completamente cheios de melanina são então transportados para os queratinócitos, localizando-se especificamente em torno do núcleo destas células (BOISSY, 2003; MORT; JACKSON; PATTON, 2015). A finalidade é que a melanina produzida pelos melanócitos proteja o DNA presente nos queratinócitos dos danos causados pela radiação ultravioleta (UV) (KANAVY HE; GERSTENBLITH MR., 2011).

A derme, camada logo abaixo da epiderme, apresenta terminações nervosas, fibroblastos, folículos capilares, glândulas sudoríparas, além de outras estruturas teciduais. As camadas da epiderme e da derme são separadas pela membrana basal, onde os melanócitos

ficam ancorados e em contato direto com cerca de 30 a 40 queratinócitos através de longas extensões dendríticas (WANG; FUKUNAGA-KALABIS; HERLYN, 2016) (Figura 1).

Figura 1 – Principais componentes celulares da epiderme e da derme. Melanócito ancorado na membrana basal, em contato com grande número de queratinócitos através das extensões dendríticas para transferência dos melanossomos produzidos no Complexo de Golgi.



Fonte: Adaptado de http://www.genomasur.com/BCH/BCH_libro/capitulo_07.htm.

A derme de um indivíduo adulto contém ainda células pluripotentes, muito parecidas com as células-tronco da crista neural, as quais são as responsáveis pela formação dos melanócitos durante o desenvolvimento embrionário. Inúmeros estudos têm demonstrado que as células de melanoma são mais parecidas fenotipicamente com células pluripotentes similares às células-tronco da crista neural, como por exemplo as células-tronco neurais (NSCs: do inglês *Neural Stem Cells*), do que com os melanócitos. As semelhanças incluem características especialmente de comportamento celular, como capacidade migratória e expressão de marcadores de superfície de membrana (FUKUNAGA-KALABIS et al., 2015). Por outro lado, a maioria das células de melanoma são indiferentes aos sinais de diferenciação, o que reflete na capacidade de proliferação, metástase e resistência às terapias (WANG; FUKUNAGA-KALABIS; HERLYN, 2016).

2.1.1 Epidemiologia do melanoma

A última publicação da Globocan (IARC; do inglês: *International Agency for Research on Cancer* – Organização Mundial de Saúde) mostra que a incidência mundial do melanoma permanece relativamente baixa, quando comparada à de outros tumores (STEWART; WILD,

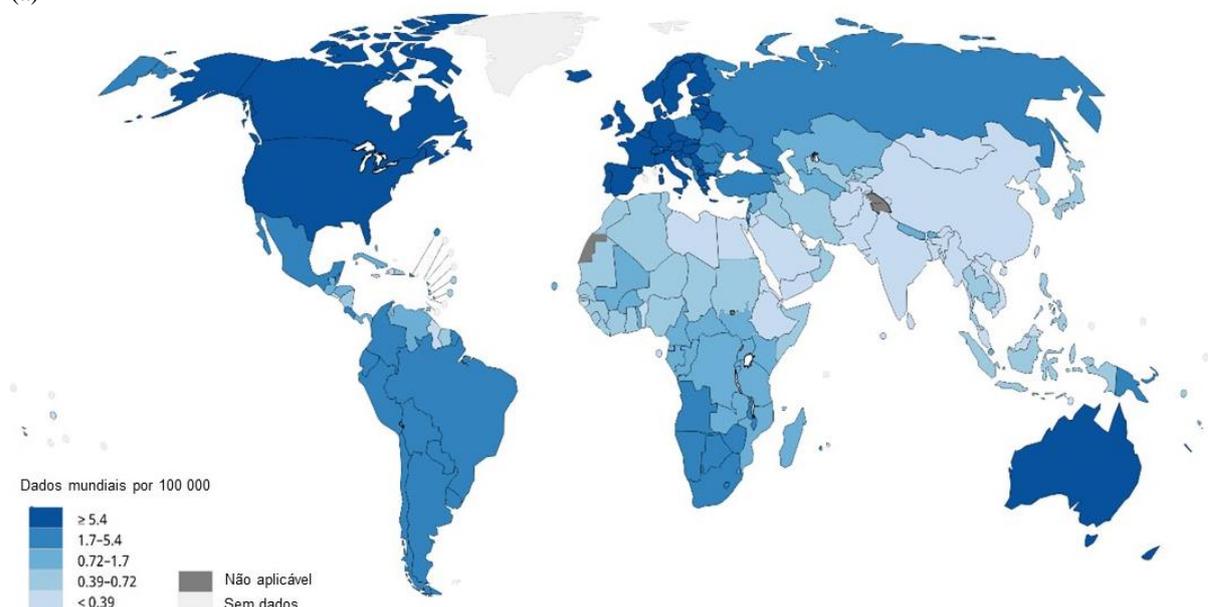
2014). Em dados mais recentes, mas ainda não compilados, a IARC estimou as taxas de incidência e mortalidade do melanoma no mundo, onde apesar de não apresentar taxas tão significativas quanto às de tumores das vias respiratórias, mama, colorretais, entre outros, é o tipo de câncer de pele mais agressivo e com taxas mais elevadas de letalidade (FERLAY et al., 2015) (Figura 2). De forma geral, o melanoma é mais comum em indivíduos caucasianos, em relação à população negra (Figura 2a, 2b), e mais frequente em homens do que mulheres (Figura 2c) (BANDARCHI et al., 2010; RAGER; BRIDGEFORD; OLLILA, 2005).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a incidência do melanoma como tumor primário no Brasil também é considerada baixa, como é possível observar na Figura 3, em comparação com os outros cânceres primários (2.920 mil casos em homens e 3.340 novos casos em mulheres; a cada 100 mil), invertendo a incidência entre os sexos, quando comparado com os dados mundiais (INCA, 2017). Para o estado de Pernambuco, as proporções da incidência do melanoma também seguem o perfil epidemiológico do Brasil, com números um pouco superior para as mulheres em relação aos homens (Figura 4).

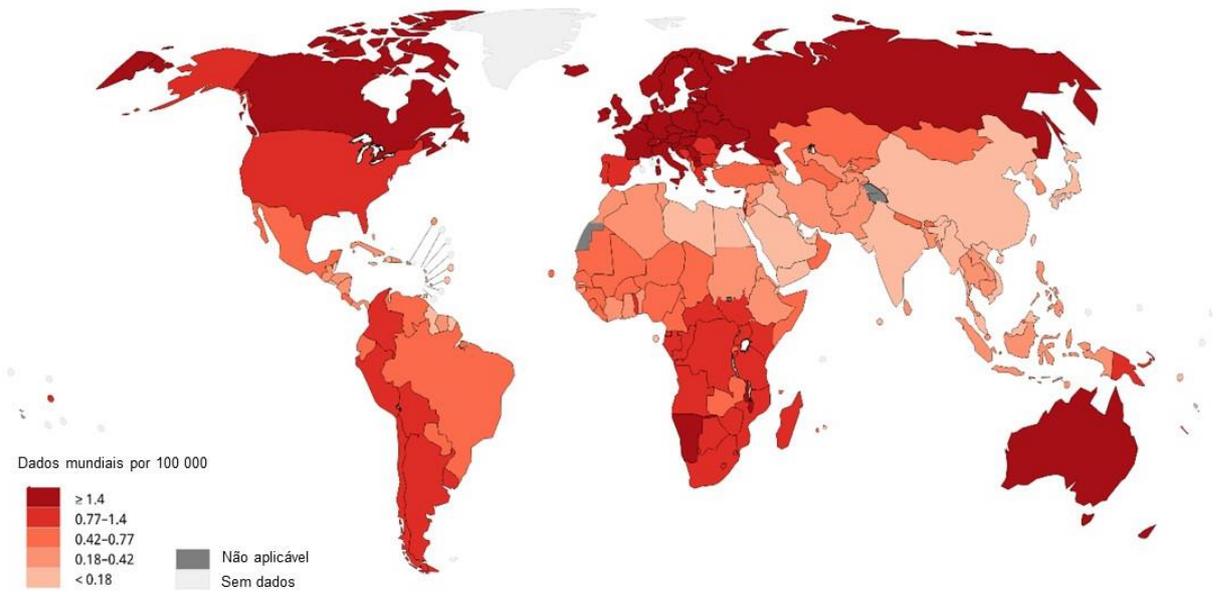
Apesar de estudos recentes na genômica do melanoma corroborarem que a principal causa é a exposição à radiação UV (HODIS et al., 2012), o INCA destaca a existência de outros importantes fatores de risco. Pessoas com histórico familiar de melanoma possuem aumento de chance de desenvolver esse tumor específico, pois a predisposição genética e a consequente presença de oncogenes são importantes fatores de risco para a melanogênese (HODIS et al., 2012).

Figura 2 – Estimativas Globocan, 2018. (a) Em azul a incidência de melanoma na população mundial, mais prevalente em países com etnia caucasiana; (b) Em vermelho, os números relacionados à mortalidade causada pelo melanoma; (c) Incidência do melanoma em homens e mulheres, por continente.

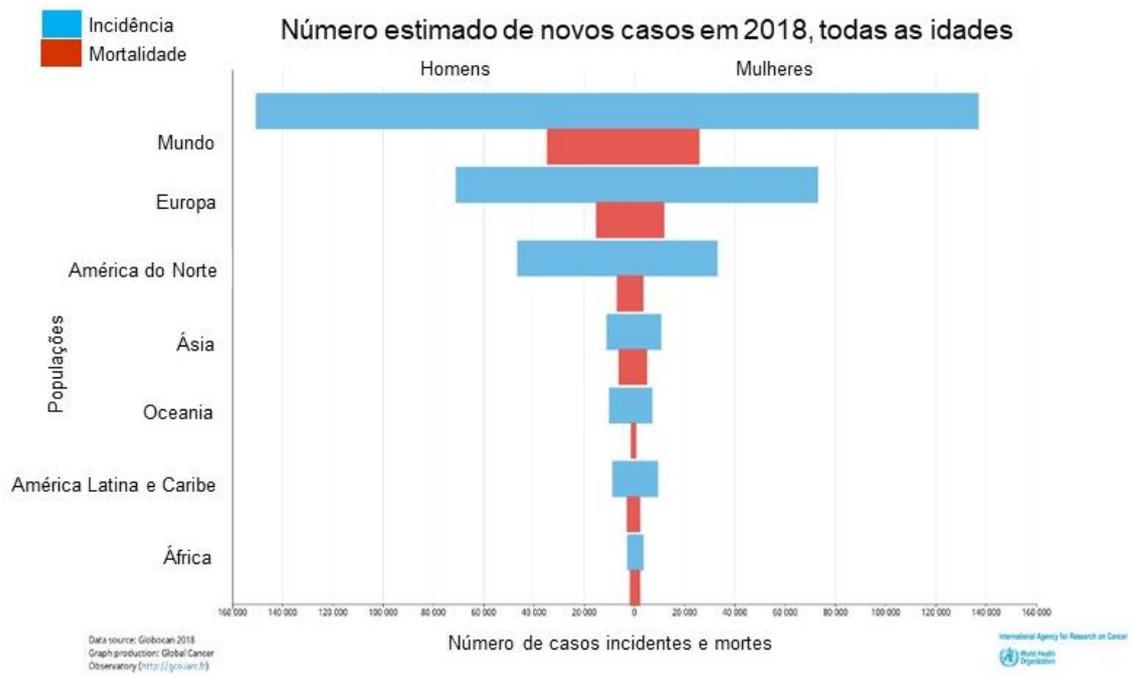
(a)



(b)



(c)



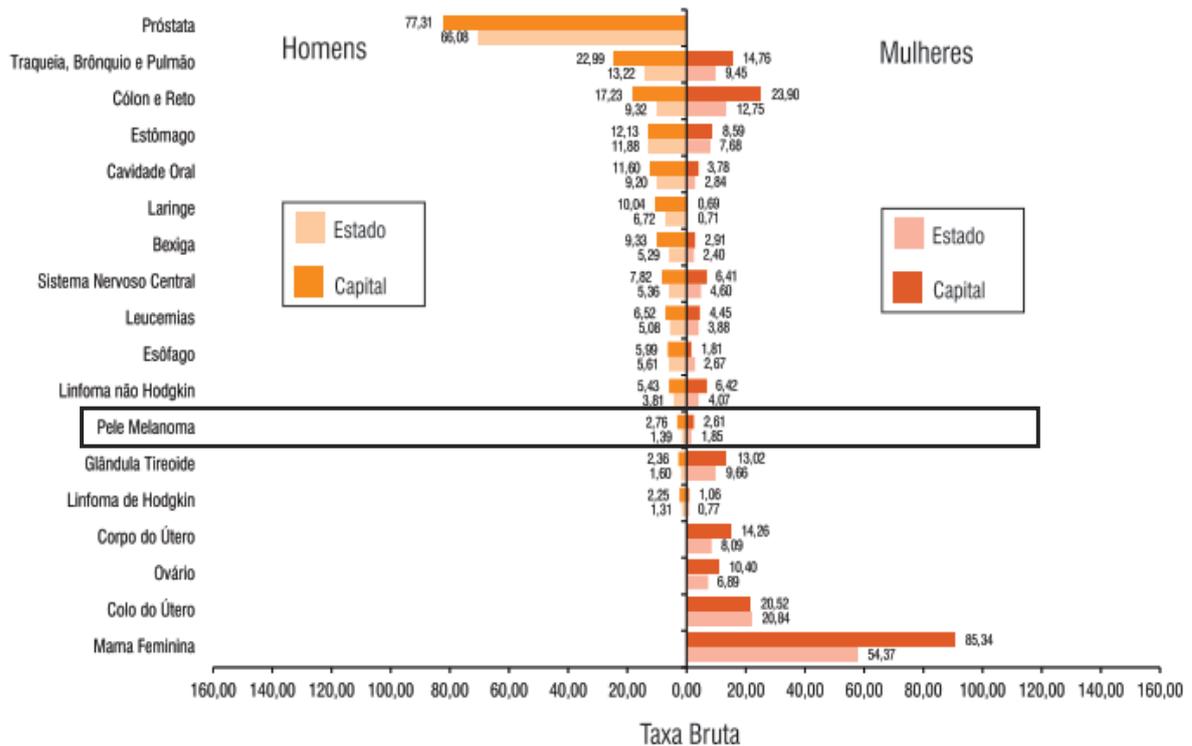
Fonte: Adaptado de (STEWART; WILD, 2014).

Figura 3 – Estimativas INCA, 2018. Estimativas para o ano de 2018 da incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária (*números arredondados para múltiplos de 10). Em destaque, os casos de melanoma.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,06	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,96	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Casos de Melanoma	-	-	-	-	-	-	6.600	6,32	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,85	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Carrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

Fonte: (INCA, 2017).

Figura 4 – Estimativas INCA para o Estado de Pernambuco, 2018. Taxas brutas de incidência estimadas para 2018 por 100 mil habitantes, por sexo, segundo Estado e capital (Pernambuco e Recife). Em destaque, os casos de melanoma.



Fonte: (INCA, 2017).

2.1.2 Fisiopatologia do melanoma

Dentro do cenário de hábitos culturais, sociais e geográficos, com associada exposição à luz solar, as lesões mais comuns ocorrem nas bochechas, pescoço, braços e mãos, tanto para homens como para mulheres, e são quase sempre relacionadas à exposição crônica ao Sol e intermitente radiação UV, mesmo artificial (CHANG et al., 2009; INGRAFFEA, 2013; RAGER; BRIDGEFORD; OLLILA, 2005). A radiação UV pode causar prejuízos diretamente através da UVB (280-315nm), a qual, apesar de ser bem menos abundante por ser parcialmente retida pela camada de ozônio, é especificamente absorvida pelo DNA humano (BENNETT, 2008; BUDDEN; BOWDEN, 2013).

Por outro lado, a radiação UVA (315-400nm) também pode ser prejudicial, mas indiretamente, pois apesar de ser absorvida dez vezes menos que a UVB, essa radiação age gerando espécies reativas de oxigênio que podem induzir danos ao DNA (KARRAN; BREM, 2016; PATTISON; RAHMANTO; DAVIES, 2012). Kamenisch et al., também demonstraram que a radiação UVA modifica o metabolismo interno dos melanócitos, resultando no aumento da expressão de metaloproteinases de matriz extracelular (MMP; do inglês: *Matrix Metalloproteinases*) e, conseqüentemente, no potencial invasivo destas células, caracterizando os eventos iniciais da metástase (KAMENISCH et al., 2016). É importante salientar que a radiação UVC (100-280nm) é a mais tóxica, porém é retida pela camada de ozônio, não havendo relação com as causas do melanoma (BUDDEN; BOWDEN, 2013).

Outra possível origem dos melanomas é o fato de que a própria síntese de melanina pelos melanócitos resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, capazes de interagir com o DNA e iniciar o processo tumoral (KABIR et al., 2015). Portanto, a manutenção da maquinaria de reparo do DNA também deve estar em perfeito funcionamento para a prevenção da tumorigênese.

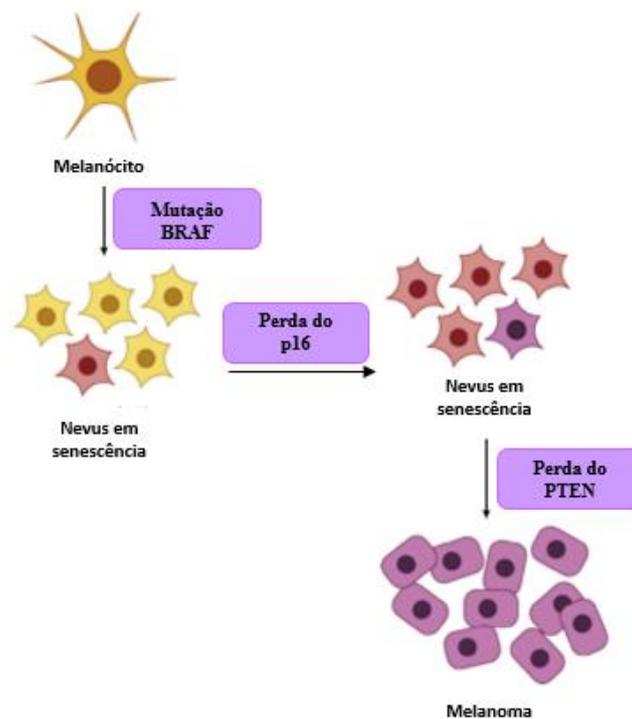
A maioria dos melanomas associa-se com mutações espontâneas em genes supressores de tumor (TP53 e PTEN), reguladores de apoptose (Bcl-2 e AKT), bem como membros de vias proliferativas RAS/RAF (ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008). Dessa forma, as famílias de genes mais estudadas para o melanoma são a superfamília Ras e a superfamília de proteínas-quinase (CICENAS et al., 2017). Essas famílias, além de gerarem mutações genéticas nos melanócitos, também influenciam geneticamente os fenótipos do sistema imune que tenta responder a essas mutações (TOMEI et al., 2015).

Na família de proteínas-quinase, o gene BRAF codifica a proteína B-raf, também conhecida como proteína quinase serina/treonina, a qual está envolvida na comunicação do

espaço extracelular para o citoplasma, através de vias de sinalização que controlam o crescimento celular. A mutação do gene BRAF é uma das mais frequentes no melanoma, onde apenas uma simples alteração genética é associada a 50% dos casos de tumor primário, além de indicar baixo prognóstico por ser presença obrigatória nos casos de metástases (DAVIES et al., 2002; SAFAEE ARDEKANI et al., 2012; SPAGNOLO et al., 2015).

A mutação em BRAF no início da transformação celular é um clássico exemplo da senescência induzida por oncogenes. Esta alteração é uma tentativa de evitar a progressão maligna induzindo o arrasto do ciclo celular e que, do ponto de vista molecular, resulta na substituição da valina pelo ácido glutâmico na posição 600, por isso ele também é referenciado como BRAF^{V600E} (ABILDGAARD; GULDBERG, 2015) (Figura 5).

Figura 5 – Modelo de transformação de melanócitos em células de melanoma devido a alterações genômicas. O oncogene BRAF induz a senescência em melanócitos, levando à formação do nevo (item 2.1.3). Outras alterações genéticas são necessárias para escapar dessa fase e avançar na progressão tumoral, como por exemplo, a perda de p16, regulador do ciclo celular, devido a mutações no gene CDKN2A ou ainda a perda de PTEN (*Phosphate and Tensin homolog*), supressor tumoral.



Fonte: Adaptado de (ABILDGAARD; GULDBERG, 2015).

As proteínas Ras participam de diversos processos intracelulares como sobrevivência, formação de citoesqueleto e transporte nuclear e vesicular (ROJAS et al., 2012). Alterações no gene Kirsten Ras (KRAS) são as mais raras no melanoma, ocorrendo em cerca de 2% dos casos (MILAGRE et al., 2011). Por outro lado, as mutações nos genes Neuroblastoma RAS (NRAS) são mais frequentes, ocorrendo entre 10 e 14% dos casos (CICENAS et al., 2017).

Causas hereditárias são as menos incidentes no âmbito do desenvolvimento tumoral. Entretanto, os primeiros genes identificados no processo de desenvolvimento de melanomas foram os genes CDK4 (do inglês: *Cyclin-Dependent Kinase-4*) e CDKN2A (do inglês: *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*), os quais codificam proteínas supressoras de tumor (p14 e p16) (GOLDSTEIN et al., 2000). Não obstante, é fundamental reiterar que mesmo os melanomas originados por causas genéticas não são resultados de uma única mutação. Na verdade, eles apresentam várias subpopulações celulares as quais podem ter uma ou mais mutações distintas.

O desenvolvimento dos melanomas procede de modificações nas relações entre os melanócitos e as demais células presentes no microambiente da pele, como os queratinócitos, sendo produto da ruptura do equilíbrio nesse local (LEE; MURPHY; LIAN, 2014). Assim, essas modificações podem ser resultado de alterações epigenéticas em associação com mutações hereditárias, ou não (WANG; FUKUNAGA-KALABIS; HERLYN, 2016).

2.1.3 Progressão do melanoma

O Modelo de Clark, clinicamente aceito até os dias de hoje, descreve que o processo de progressão do melanoma se inicia com a proliferação descontrolada dos melanócitos, originando o *nevus* benigno (não tumoral) ou displásico (pré-neoplásico), os quais podem abrigar mutações oncogênicas (ROH et al., 2015). Essa fase permanece em senescência induzida pelos próprios oncogenes (MICHALOGLOU et al., 2005) até que, eventualmente, em meses ou décadas, alguns melanócitos transformados podem avançar para a fase do melanoma de crescimento radial (RGP; do inglês: *Radial Growth Phase*), apesar de ainda apresentarem reduzida proliferação para além da derme.

As células em RGP são extremamente susceptíveis a mudanças moleculares do microambiente, como sinais que estimulam suas propriedades proliferativas e agressivas, culminando na invasão da derme e sua progressão para o melanoma de crescimento vertical (VGP; do inglês: *Vertical Growth Phase*). A partir de então, as células em VGP, com maior capacidade migratória e invasiva, podem adquirir a habilidade de colonizar órgãos distantes do sítio primário, estabelecendo o processo de metástase (Figura 6) (CLARK et al., 1984; ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008).

Como dito anteriormente, em situações de homeostase, os queratinócitos são os responsáveis pelo controle da motilidade dos melanócitos, via caderinas, conexinas e demais receptores de adesão celular (HAASS et al., 2005; KUPHAL; BOSSERHOFF, 2012). É sabido que com a progressiva transformação dos melanócitos em células de melanoma, estas

conseguem escapar do controle dos queratinócitos, permitindo cada vez mais sua independência migratória, através de três possíveis mecanismos.

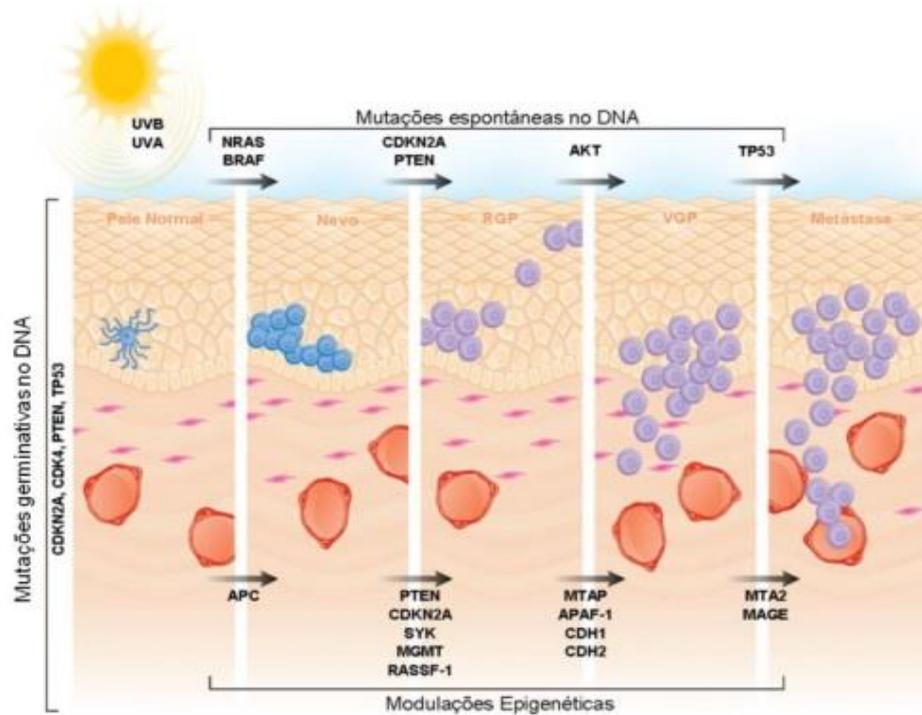
Primeiramente, as células de melanoma são capazes de reduzir a expressão de receptores intercelulares como a E-caderina, a P-caderina e conexinas (KUPHAL; BOSSERHOFF, 2006; NISHIMURA et al., 1999); As células transformadas podem também aumentar a expressão de receptores e sinalizadores tumorais como a N-caderina (KUPHAL; BOSSERHOFF, 2006); E, por fim, as células de melanoma podem ainda alterar a expressão de integrinas na membrana basal onde estão ancoradas com o objetivo exatamente de adquirirem mais motilidade (SIRET et al., 2015).

Por outro lado, os mesmos queratinócitos produzem e liberam o fator de crescimento de hepatócitos, também chamado de fator de dispersão (HGF; do inglês: *Hepatocyte Growth Factor* ou SF; do inglês: *Scatter Factor*) para o meio extracelular, mesmo quando já existem células de melanoma no sítio primário. Por sua vez, o HGF/SF pode agir promovendo a secreção de MMPs, como a MMP-9, para a quebra da matriz extracelular e aumento da capacidade migratória das células de melanoma (VAN KILSDONK et al., 2010). Esse mesmo fator pode ainda ativar a sinalização Notch, a qual induz o processo invasivo para células tumorais como uma terceira via (GOLAN et al., 2015).

Contudo, é essencial entender que metade dos melanomas surge de melanócitos isolados (GADELIYA GOODSON; GROSSMAN, 2009) e apenas a outra metade é originária de *nevus* (SHAIN et al., 2015). Isto ocorre devido ao fato de as fases de seu desenvolvimento serem independentes umas das outras (DAMSKY; THEODOSAKIS; BOSENBERG, 2013), estando cada uma sob influências genéticas e epigenéticas as quais poderão ter resultados bastante distintos (ZAIDI; DAY; MERLINO, 2008).

Dessa forma, é possível notar que o melanoma se particulariza essencialmente pela diversa heterogeneidade genética e molecular, tanto nos tumores primários como nos metastáticos. Tal conjunto singular é certamente o principal responsável pelas características malignas observadas conseqüentemente na alta resistência aos tratamentos e seus altos potenciais metastáticos.

Figura 6 – Alterações moleculares decorrentes de alterações genéticas e epigenéticas. Mutações envolvidas na progressão do melanoma, bem como alterações epigenéticas que também influenciam o desenvolvimento tumoral. Todas as fases representadas são acompanhadas de mutações independentes e/ou hereditárias, além de influenciadas pelas alterações epigenéticas, não ocorrendo na linearidade didaticamente proposta pelo modelo de Clark. Genes envolvidos: Akt: Proteína Quinase B; APAF-1: *Apoptotic protease activating factor 1*; APC: *Adenomatous polyposis C*; CDH1 e CDH2: *Cadherin gene 1 e 2*; CDKN: *Cyclin Dependent*; MAGE: *Melanoma-associated antigen*; MGMT: *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*; MTA2: *Metastasis Associated 1 Family Member 2*; MTAP: *Methylthioadenosine Phosphorylase*; PTEN: Phosphatase and Tensin homolog; Kinase Inhibitor; RASSF: *Ras association Family*; SYK: *Spleen tyrosine kinase*; TP53: *Tumor protein 53*.



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

2.2 METÁSTASE

Metástase é o processo pelo qual as células do tumor primário se disseminam e se estabelecem em outro órgão, por vezes, distante do sítio inicial (COGHLIN; MURRAY, 2010; SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013). Por isso, quando o processo de metástase é diagnosticado, as chances de que o tratamento tenha efeito e o resultado de cura ficam mais distantes. Atualmente, a metástase tumoral é a maior causa de morbidade e mortalidade, sendo responsável por 90% das mortes relacionadas ao câncer (SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013). Consequentemente, a meta na prática clínica se reduz a minimizar o sofrimento no período de sobrevivência do paciente o máximo possível devido à baixa eficiência terapêutica disponível.

A sucessão dos eventos complexos que compõem o processo metastático é descrita na Cascata Invasão-Metástase. De forma geral, envolve o (1) desenvolvimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese), (2) a deadesão das células metastáticas do tumor primário, (3) a invasão da membrana basal, matriz extracelular e do endotélio dos vasos sanguíneos e/ou

linfáticos que circundam o microambiente tumoral, (4) a intravasão dessas células para os vasos, (5) a posterior extravasão dessas células para o órgão secundário e, por fim, (6) a colonização e crescimento das colônias tumorais no novo ambiente tumoral (COGHLIN; MURRAY, 2010; KLEIN, 2008).

Para que todo esse processo ocorra, as células tumorais vivenciam ainda no sítio primário alterações moleculares e morfológicas que compõem a Transição Epitélio-Mesênquima (TEM), assim como, ao alcançar o sítio secundário, essas alterações são revertidas para o *status* inicial, através da Transição Mesênquima-Epitélio (YEUNG; YANG, 2017).

Essas modificações se resumem à perda de características epiteliais como a adesão celular promovida por proteínas como E-caderina e citoqueratinas, a perda da morfologia polar basal-apical, bem como o ganho de proteínas como Vimentina e N-caderina, responsáveis pelo fenótipo mesenquimal (CHEN et al., 2017; RIBATTI, 2017). Como essas características epiteliais não permitem a livre movimentação celular, as células tumorais precisam perdê-las para que possam alcançar os órgãos secundários pré-metastáticos. Entretanto, dentro do contexto da heterogeneidade celular do melanoma, o processo de TEM que ocorre nessas células também não segue os padrões vistos nos demais tumores (KIM et al., 2013).

O fator de transcrição associado à microftalmia (MITF; do inglês: *Microphthalmia-associated transcription factor*) é o “mestre regulador” do crescimento e da diferenciação melanocítica em condições normais, sendo responsável pelo controle de enzimas para síntese de melanina, proteínas dos melanossomas e vias do ciclo celular, como CDKN1A e CDKN2A, e de sobrevivência, como BCL2 e HIF1A, além ainda do reparo e replicação do DNA (LEVY; KHALED; FISHER, 2006; PLOPER; ROBERTIS, 2015; SEBERG et al., 2017; STRUB et al., 2011).

Apesar de seu papel na TEM e na progressão tumoral ser complexo e ainda não ser completamente elucidado, sabe-se que a alta expressão de MITF pelas células de melanoma reduz as vias de sinalização relacionadas à invasão, ao mesmo tempo que aumentam a proliferação e sobrevivência celular (HARTMAN; CZYZ, 2014; PEARLMAN et al., 2017). Kim et al. demonstraram em um modelo *in vivo* que na TEM de melanomas as alterações moleculares envolvem inúmeras vias de sinalização, mas podem ser caracterizadas basicamente pela alta expressão de E-caderina e MITF no fenótipo de diferenciação e pela alta expressão de N-caderina no fenótipo invasivo, sem implicar obrigatoriamente, por exemplo, na total ausência de MITF neste último fenótipo (KIM et al., 2013).

Diante da importância do MITF para os melanócitos e para as células de melanoma, bem como dos papéis às vezes conflitantes desse fator de transcrição, Goding et al., propuseram o modelo atualmente aceito, onde os fenótipos proliferativo, invasivo e de senescência são determinados de acordo com os níveis de MITF. Assim, a alta expressão de MITF (MITF^{HIGH}) promove diferenciação e senescência, uma expressão intermediária (MITF^{MID-LEVEL}) proliferação, e a baixa expressão (MITF^{LOW}) promove o fenótipo invasivo (AIDA et al., 2017; BALLOTTI; BERTOLOTTI, 2017; CARREIRA et al., 2006; HOEK; GODING, 2010; TUDREJ; CZEPIELEWSKA; KOZŁOWSKA-WOJCIECHOWSKA, 2017). É importante salientar que esses fenótipos não são homogêneos para todos os tumores primários. São fenótipos específicos de subpopulações intratumorais, onde o mesmo tumor primário pode apresentar fenótipos ora majoritariamente invasivos, ora majoritariamente proliferativos, mas independentes para cada subpopulação (ENNEN et al., 2017; VACHTENHEIM; ONDRUSOVÁ, 2015).

Assim, a quantidade de MITF expressa pelo melanoma varia de acordo com as influências genéticas e epigenéticas que as células sofrem no microambiente (AHMED; HAASS, 2018; PIERRAT et al., 2012; WELLBROCK; AROZARENA, 2015a). Um dos principais repressores da expressão do MITF é o também chamado “mestre regulador” da diferenciação neuronal, o fator de transcrição Brain-2 (BRN2) (GOODALL et al., 2008; HUANG et al., 2005). O BRN2 é codificado pelo domínio gênico POU3F2 e é responsável, em condições normais, pela neurogênese, migração neuronal e organização das camadas neuronais no córtex cerebral (DOMINGUEZ; AYOUB; RAKIC, 2013; DONALDSON et al., 2006; MCEVILLY et al., 2002).

Já na progressão tumoral do melanoma, o BRN2 tem sido implicado com um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento do comportamento invasivo, atuando diretamente no controle da expressão de MITF. Interessantemente, os padrões comportamentais descritos pela expressão de MITF são relacionados à baixa expressão de BRN2, enquanto a presença deste último inibe os comportamentos regulados por MITF, por exemplo, a presença de BRN2 resulta na perda de diferenciação de melanócitos e ganho de motilidade por essas células, comumente de fenótipo epitelial (FANE et al., 2017a; GOODALL et al., 2004; THURBER et al., 2011).

Entretanto, a forma como BRN2 regula MITF ainda está sendo esclarecida, dado alguns papéis controversos relatados na literatura recente. Enquanto alguns grupos mostram que o BRN2 se liga diretamente à região promotora de MITF, reprimindo sua expressão, outros reportam que o BRN2 age como regulador positivo do MITF e do crescimento e proliferação

do melanoma, sugerindo uma dualidade funcional para esse fator de transcrição (GOODALL et al., 2008; PINNER et al., 2009; THURBER et al., 2011; WELLBROCK et al., 2008).

Por outro lado, estudos também mostraram que, independente do resultado da regulação de MITF por BRN2, ela é reprimida ou ativada também de acordo com os estímulos do microambiente. Quando as células de melanoma atingem o *status* de invasão, por exemplo, a repressão de BRN2 sobre MITF e/ou o fenótipo com motilidade e características mesenquimais são suspensos, prevalecendo as características de proliferação e crescimento no sítio metastático (PINNER et al., 2009). Essa flexibilidade comportamental do melanoma é certamente uma das responsáveis pela conseqüente agressividade desse tumor, dada a capacidade de adaptação que o mesmo apresenta.

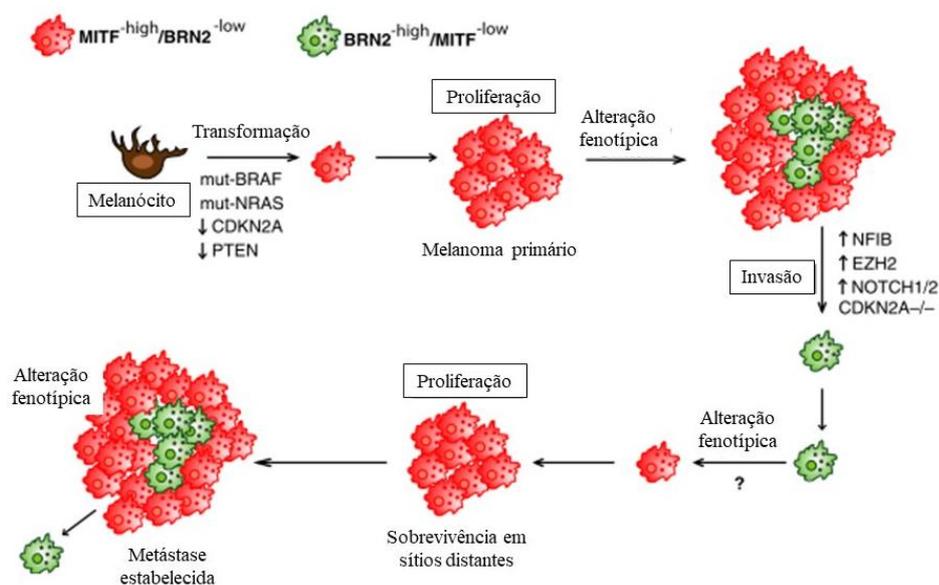
Outros reguladores da expressão de MITF são a hipóxia, a qual seleciona no microambiente tumoral as células mais resistentes, resultando numa redução de MITF e conseqüente fenótipo invasivo; bem como a privação de glicose em subpopulações intratumorais, que ao também selecionar as células mais agressivas, induz uma reprogramação metabólica, a qual resulta na mudança fenotípica para o *status* invasivo (FERGUSON et al., 2017; FISHER et al., 2011; O'CONNELL; WEERARATNA, 2013). Mais uma vez, entende-se que o principal regulador de todos os mecanismos da progressão tumoral e estabelecimento metastático é o microambiente (Figura 7).

Na prática clínica, o principal efeito da heterogeneidade celular intratumoral do melanoma é o fato de que sua agressividade precede em muito o diagnóstico e o início do tratamento, dado o ainda não consolidado conhecimento sobre a TEM e o processo metastático singulares do melanoma. Atualmente, muitos pacientes atingem a cura do melanoma após a retirada cirúrgica do tumor primário (PIÉRARD et al., 2012), terapêutica da linha de frente dos tratamentos disponíveis. No entanto, os dados estatísticos ainda ressaltam o alto número de casos de recorrência e morte por metástase, mesmo após a remoção do tumor (DAMSKY; ROSENBAUM; BOSENBERG, 2011; NAYAK; LEE; WEN, 2012; PIÉRARD-FRANCHIMONT et al., 2014).

De acordo com a hipótese “*Seed and Soil*” de Paget (1889), os tumores primários têm órgãos secundários previamente determinados segundo algumas compatibilidades que favoreçam sua invasão e colonização (HANAHAN; WEINBERG, 2011; RAMAKRISHNA; ROSTOMILY, 2013). Dessa forma, o melanoma estabelece metástase comumente em sítios secundários que lhe favorecem de alguma forma específica. Em ordem de incidência, o melanoma maligno metastiza com mais frequência no pulmão (TAKEDA et al., 2011), no

cérebro (FONKEM et al., 2012), no fígado e nos ossos (CORREA et al., 2016), incluindo a possibilidade de colonizar mais de um sítio concomitantemente (DAMSKY; ROSENBAUM; BOSENBERG, 2011).

Figura 7 – Alterações fenotípicas do melanoma reguladas pelo eixo BRN2-MITF. O melanoma primário é resultado da transformação de melanócitos, devido às mutações gênicas como BRAF e NRAS, as quais induzem redução de PTEN e CDKN2A. A proliferação do melanoma primário requer o fator de transcrição MITF. A alteração fenotípica ocorre através de mecanismos intrínsecos ou em resposta a estímulos externos do microambiente, como hipóxia ou deprivação de nutrientes, os quais promovem a redução da expressão de MITF e aumenta a expressão de BRN2. As células BRN2^{HIGH}/MITF^{LOW} apresentam então maior capacidade migratória e de invasão. As células invasoras formam então as metástases em sítios secundários, seguida do processo reverso para um fenótipo proliferativo caracterizado por um perfil de expressão MITF^{HIGH}/BRN2^{LOW}, permitindo o crescimento metastático em tecidos distantes. BRN2: *Brain-2*; CDKN: *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor*; EZH2: *Enhancer of zeste homolog 2*; MITF: *Microphthalmia-associated transcription factor*; NFIB: *Nuclear Factor 1B*.



Fonte: Adaptado de (FANE et al., 2019).

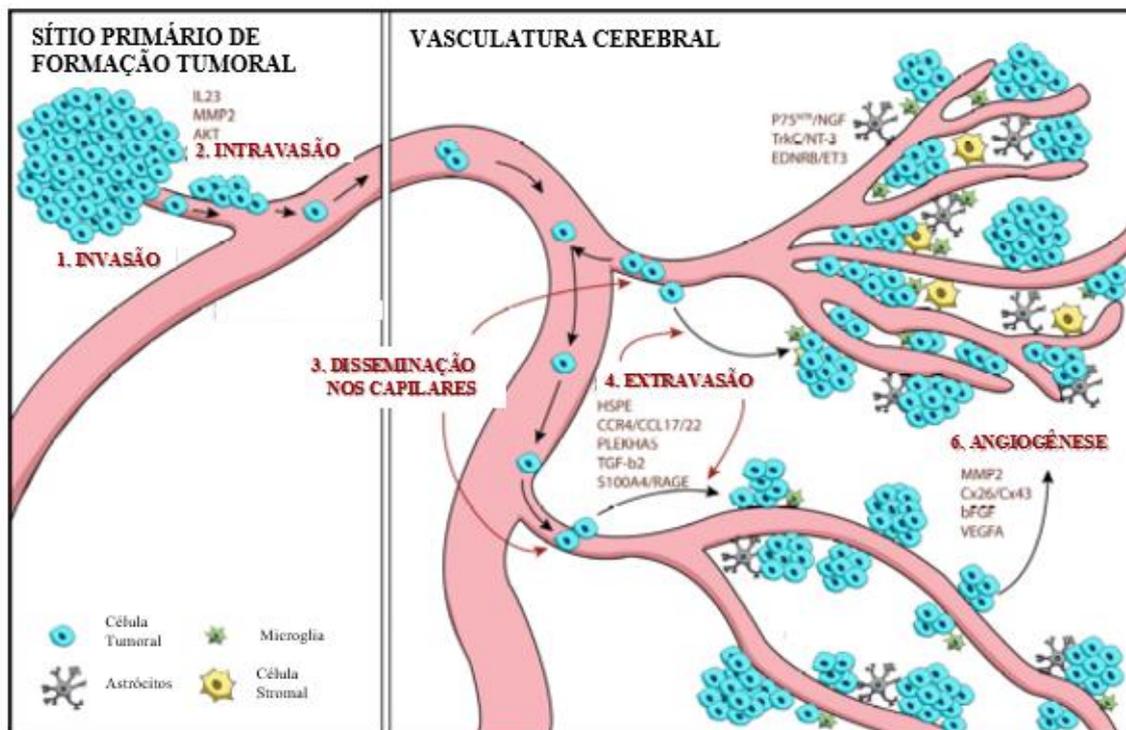
2.2.1 Metástase cerebral de melanoma

O desenvolvimento da metástase cerebral é um grande desafio clínico devido sua associação a um baixo prognóstico, diversos prejuízos neurológicos e, consequentes, reduzida qualidade de vida e tempo de sobrevivência (KIBBI; KLUGER, 2016; STELZER, 2013; VENUR; AHLUWALIA, 2015). Uma vez diagnosticada a metástase cerebral, os pacientes têm em média 2 a 12 meses de sobrevivência e os dados indicam que a incidência e mortalidade calculadas são subestimadas em relação aos números reais (NAYAK; LEE; WEN, 2012; NI; CHEN; LU, 2018). Estudos epidemiológicos mostram que a metástase cerebral de melanoma tem preferência maior para o córtex cerebral, sendo menos frequente em outras áreas como o núcleo da substância cinzenta, a substância branca, as leptomeninges e a dura-máter (DAMSKY; ROSENBAUM; BOSENBERG, 2011).

As mortes devido à metástase de melanoma ocorrem em cerca de 20 a 54% dos casos, sendo o cérebro o segundo sítio mais comum dentre os órgãos secundários preferidos por esse tumor (FONKEM et al., 2012; STELZER, 2013). No caso do melanoma como tumor primário, embora apenas 7% dos pacientes sejam diagnosticados com metástase cerebral, cerca de 40% desenvolvem sinais clínicos ao longo da progressão do câncer e, nas autópsias, quase 70% dos casos apresentam o cérebro envolvido nos processos metastáticos desse tumor (CAGNEY et al., 2017; KIBBI; KLUGER, 2016).

O microambiente cerebral se faz único devido à seletividade da barreira hematoencefálica (BHE), à presença de células imunes específicas (micróglia) e seu considerável consumo de energia e nutrientes (PALMIERI et al., 2007; WROBEL; TOBOREK, 2016). Apesar da BHE ser bastante seletiva para inúmeros tratamentos contra o câncer, ainda não é bem entendido como ela permite a passagem de células tumorais (FABI et al., 2011) (Figura 8).

Figura 8 – Principais passos e fatores no estabelecimento da metástase cerebral do melanoma. A cascata invasão-metástase do melanoma para o cérebro resulta do envolvimento de diversas moléculas, as quais atuam a favor e contra a progressão tumoral. IL-23: Interleucina-23; MMP-2: Metaloproteinase-2; Akt: Proteína-quinase B; CCR-4: Receptor de quimiocina-4; CCL17/22: Ligante de quimiocinas 17 e 22; TGFb-2: Fator de crescimento tumoral beta-2; S100A4: Proteína ligante de Cálcio-4; NGF: Fator de crescimento neural; EDNRB: Receptor de endotelina tipo-B; Cx26/43: Conexinas 26 e 43; bFGF: Fator básico de crescimento de fibroblastos.



Fonte: Modificado de (KIRCHER et al., 2016).

Uma hipótese geral é que as células metastáticas influenciam as células endoteliais da BHE a alterarem sua permeabilidade, de forma direta ou parácrina (JIA et al., 2013; LANGLEY; FIDLER, 2013). A fim de penetrar entre as células endoteliais, as células tumorais secretam diversas proteases para degradação das junções aderentes (AURRAND-LIONS et al., 2005; WOLBURG; LIPPOLDT, 2002). Citocinas, quimiocinas e mediadores inflamatórios, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF; do inglês: *vascular endothelial growth factor*), fator de crescimento transformador- β (TGF- β ; do inglês: *transforming growth factor- β*), interferon- γ (IFN- γ), CCL2 (do inglês: *C-C Motif Chemokine Ligand 2*), CXCL8 (do inglês: *C-X-C Motif Chemokine Ligand 8*) e MMPs secretados pelas células tumorais também são capazes de desestabilizar as junções aderentes e permitir a passagem entre as células endoteliais (FENG et al., 2011; STAMATOVIC; KEEP; ANDJELKOVIC, 2008).

As células da micróglia são o sistema imunológico específico do microambiente cerebral. Seu papel na metástase cerebral ainda não foi completamente elucidado, mas sabe-se que alguns mecanismos de neuroinflamação da micróglia são utilizados pelas células tumorais em seu próprio benefício. Recentemente, Izraely e colaboradores (2018) demonstraram que interações diretas e indiretas entre células de melanoma e micróglia resultam em maior secreção e ativação de MMPs, penetração celular através das células endoteliais, proliferação e migração celular do melanoma e alterações morfológicas nas células de defesa (IZRAELY et al., 2018).

2.2.1.1 Astrócitos

Dentro da conjuntura do microambiente cerebral, os astrócitos têm significativa relevância fisiológica para o sistema nervoso, sendo inclusive as células mais numerosas no cérebro. Em condições normais, eles têm como função básica dar suporte estrutural, funcional e de nutrientes para os neurônios, desde o desenvolvimento do sistema nervoso central até o adequado funcionamento da rede neural no cérebro maduro, compondo o tipo de células da glia mais importante (KHAKH; SOFRONIEW, 2015; OBERHEIM; GOLDMAN; NEDERGAARD, 2012; WANG; BORDEY, 2008).

Quando as células tumorais conseguem atravessar a BHE, encontram Fas ligante (FasL), molécula secretada pelos astrócitos, que desencadeia o fenômeno de apoptose para eliminação das células invasoras. Por sua vez, as células resistentes liberam serpinas que inibem a secreção do FasL pelos astrócitos (VALIENTE et al., 2014). A partir desse momento, as células tumorais passam a se beneficiar do importante papel dos astrócitos no microambiente cerebral. Através da rápida comunicação por *gap junctions* entre os astrócitos, os mesmos induzem uma maior expressão de genes de sobrevivência para as células tumorais e inibem a expressão do supressor tumoral PTEN, facilitando o estabelecimento da metástase e promovendo ainda uma maior

resistência à quimioterapia (ALEČKOVIĆ; KANG, 2015; FIDLER et al., 2015; LIM et al., 2011).

Marchetti e colaboradores (2000) já haviam demonstrado que a produção de heparanase pelos próprios astrócitos, presentes próximos do endotélio da BHE, facilita a passagem de células de melanoma, clivando as junções aderentes intercelulares (MARCHETTI; LI; SHEN, 2000). O mesmo grupo de pesquisadores, posteriormente, mostrou ainda que o co-cultivo de células de melanoma e astrócitos aumenta ainda mais a produção da enzima por essas células cerebrais (MURRY et al., 2006). Corroborando essa estratégia para travessia da BHE por células de melanoma, também foi demonstrado que a inibição de heparanase inibiu a migração celular de melanoma *in vitro* (LIU et al., 2012). A heparanase é uma enzima que degrada cadeias de proteoglicanos de sulfato de heparan, os quais são bastante expressos em células tumorais, sendo correlacionados com seu potencial metastático (VLODAVSKY et al., 2002).

Klein e colaboradores (2015) mostraram que células de melanoma foram capazes de reprogramar astrócitos para que estes expressassem fatores pró-inflamatórios como a interleucina-23 (IL-23). De maneira recíproca, os astrócitos aumentaram a secreção da MMP-2 pelas células de melanoma. As duas sinalizações resultaram num aumento da invasividade das células de melanoma no processo metastático cerebral, visto que quando as abordagens foram inibidas isoladamente, a migração tumoral também o foi (KLEIN et al., 2015).

Entretanto, apesar de ainda não se saber todos os possíveis mecanismos através dos quais os astrócitos são induzidos a facilitar a metástase cerebral pelas células tumorais, entende-se que seu papel no ambiente homeostático e na condição patológica é tão importante quanto. Fazendo-se necessário estudos mais aprofundados acerca das suas ações dentro do microambiente cerebral e não de forma isolada.

2.3 MODELOS PARA O ESTUDO DO CÂNCER

Há décadas, os modelos *in vivo* e/ou *in vitro* são a principal ferramenta para o estudo de diversas doenças, especialmente quando se sabe das questões epidemiológicas acerca da mesma, e não seria diferente no cenário do câncer. Cada modelo tem suas vantagens e desvantagens, dentro de suas possibilidades e limitações, sendo impossível definir um único modelo como mais adequado ou sem nenhuma desvantagem.

Os modelos animais têm a grande vantagem de contextualizar o objeto de pesquisa em um organismo vivo, com todas as interações fisiológicas que compõem o estabelecimento ou a progressão do tumor estudado (PÉREZ-GUIJARRO et al., 2017). No que concerne ao estudo de novos compostos terapêuticos, após uma triagem inicial *in vitro*, os modelos animais

imunocomprometidos se apresentam como as melhores opções para avaliação do efeito antitumoral desses novos fármacos (PÉREZ-GUIJARRO et al., 2017).

Os modelos xenográficos também trazem as vantagens de entender o comportamento tumoral e as respostas terapêuticas de tumores humanos onde o modelo em estudo é um camundongo (RICHMOND; SU, 2008). São modelos fáceis de desenvolver e manusear, além de fornecerem resultados em poucas semanas-meses, dada a facilidade com que os tumores progridem nos animais imunodeficientes (RICHMOND; SU, 2008; SANMAMED et al., 2016).

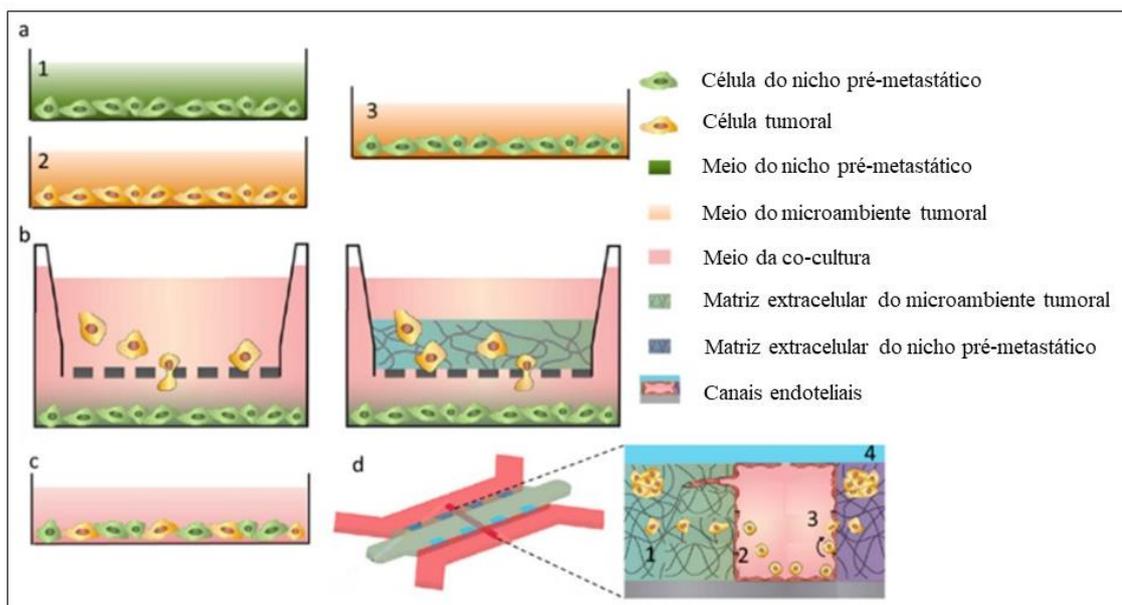
Entretanto, no que concerne ao estudo da biologia tumoral, esses modelos trazem desvantagens no sentido de não refletirem as interações celulares que ocorrem nos tumores reais, exatamente pelo fato desses animais não terem sistema imunológico ativo, o qual é um dos principais atores do estabelecimento e progressão do câncer (JANSSEN et al., 2017; JUNTILA; DE SAUVAGE, 2013). Da mesma forma, a mesma vantagem citada anteriormente, sobre as interações fisiológicas que os modelos animais apresentam, também se mostra como ponto negativo no caso da metástase, visto que o animal precisa apresentar todos os passos da cascata invasão-metástase, sobreviver a eles e sobreviver às intervenções feitas durante o estudo (SANMAMED et al., 2016).

O menor controle nas variáveis experimentais, as diferenças biológicas entre animais da própria espécie, entre outros pontos também são pontos negativos dos modelos *in vivo* no estudo do comportamento tumoral (EVANS et al., 2015). Sem esquecer ainda que os modelos animais de melanoma podem ainda ser gerados a partir de agentes carcinogênicos, radiação ultravioleta e animais geneticamente modificados pela a depleção/mutação de genes específicos, cada um apresentando também suas vantagens e desvantagens para o objeto de estudo escolhido (SALEH, 2018).

Da mesma forma, os modelos *in vitro* também têm seus ganhos e limitações, mas mesmo em sistemas muito simples, eles podem representar uma importante ferramenta, permitindo a análise de mecanismos moleculares em condições altamente controladas e com o uso de metodologias analíticas de alta resolução. Dentro das possibilidades *in vitro* destacam-se as monocamadas, as co-culturas, as culturas tridimensionais, os organoides, o uso de meio condicionado para interações indiretas, o isolamento da matriz extracelular, dentre outras (Figura 9) (ARRIGONI et al., 2016; BERSINI et al., 2014a; KATT et al., 2016). O estudo da metástase *in vitro* depende ainda de modelos específicos para cada fase da cascata invasão-metástase, com o objetivo de elucidar exatamente que interações celulares e moleculares ocorrem para o sucesso de cada etapa (BERSINI et al., 2014b).

O sistema de meio condicionado permite o estudo das reações celulares frente ao contato com fatores solúveis liberados pelo sítio primário tumoral ou pelo nicho pré-metastático (DE OLIVEIRA BARROS et al., 2014). Tal sistema pode ser utilizado para inúmeras finalidades como estudo de migração, proliferação, análise de citocinas e quimiocinas, ciclo celular, entre outros. O ensaio por *transwell* traz a vantagem de permitir a análise de comportamento invasivo, proliferação, além de outros, já que as células compartilham uma interação indireta, convivendo num mesmo meio de cultura, mas sem estarem em contato umas com as outras (BERSINI et al., 2014b).

Figura 9. Esquemática de diferentes métodos de estudo in vitro da metástase. (a) Meio condicionado de cultura. Meio de cultura da população (2) é usado na população (1), originando um sistema indireto e unidirecional de co-cultivo (3); (b) Esquerda: co-cultura por *transwell*: população (1) é plaqueada no fundo da placa de cultivo e a população (2) é plaqueada no enxerto poroso, permitindo a troca de fatores solúveis, migração celular através da membrana porosa mas sem o contato entre as duas populações; Direita: *Transwell* pode ser usado para análise de invasão, ao revestir a membrana porosa com uma camada de matriz extracelular; (c) Sistema de co-cultura direta em 2D, no qual as duas populações interagem diretamente, compartilhando o mesmo meio de cultura; (d) Exemplo de sistema de co-cultivo avançado, permitindo um resumo do processo metastático, desde a migração inicial das células a partir do tumor primário (1), intravasão (2), adesão e extravasão (3) através do endotélio e o crescimento da metástase (4).



Fonte: Adaptado de (KATT et al., 2016).

Já o sistema de co-cultura bidimensional permite a análise das interações diretas entre as células, bem como de sinalização parácrina, no estudo do sobrenadante comum às células (ARRIGONI et al., 2016; TAUBENBERGER, 2014). Entretanto, a complexidade do modelo pode ser controlada dentro dos componentes e microambientes que são escolhidos para serem estudados e devem ser levados em consideração como primeiro passo na decisão do modelo a ser utilizado (COMMANDEUR et al., 2014). Os modelos tridimensionais permitem a análise das interações celulares e com o microambiente extracelular no âmbito da organização

estrutural, morfologia tridimensional, com uma distribuição de nutrientes e oxigênio mais similar ao que ocorre na massa tumoral de fato (GURSKI et al., 2012; XU; FARACH-CARSON; JIA, 2015).

A escolha dos modelos *in vivo* e *in vitro* deve ser feita de acordo com as perguntas a serem respondidas. As diversas ferramentas de estudo existentes são extremamente úteis para o fim o qual foram desenvolvidos para alcançar, e a limitação específica de cada um deve ser respeitada e levada em consideração na interpretação dos achados.

Não existe modelo perfeito e que atenda a todos os requisitos celulares e moleculares para o estudo da metástase, dada a complexidade de todos os passos desse processo. Contudo, a busca por modelos que apresentem diferenciais importantes para esse estudo e que solucionem problemas que outros modelos apresentaram anteriormente se faz incessante e imprescindível no cenário do câncer mundial atualmente, seja objetivando a pesquisa sobre o comportamento tumoral, seja no desenvolvimento de novos tratamentos antineoplásicos.

2.4 TRATAMENTOS PARA O MELANOMA

Há cerca de 30 anos, o quimioterápico mais ativo para o tratamento do melanoma é a Dacarbazina (DAC) (EGGERMONT; KIRKWOOD, 2004). A DAC é um agente alquilante que causa danos no DNA através da metilação dos ácidos nucleicos, o que resulta na morte celular por apoptose (LUKE; SCHWARTZ, 2013). Apesar de ainda ser considerada como tratamento padrão, a DAC apresenta uma taxa de resposta muito baixa, entre 10% e 20% e taxa de sobrevivência de três a seis meses, apresentando com resposta completa em menos de 5% dos casos (MIDDLETON et al., 2000). Pela habilidade de atravessar a BHE, a DAC também tem sido utilizada contra a metástase cerebral de melanoma (LUKE; SCHWARTZ, 2013). Os efeitos colaterais que a DAC provoca também estão entre os mais prejudiciais, desde náuseas e vômito a supressão de células sanguíneas pela medula óssea, causando anemia e leucopenia (EGGERMONT; KIRKWOOD, 2004).

Devido à baixa eficácia dos tratamentos com quimioterapias isoladas de forma geral, a combinação de quimioterápicos já há muito é vista como uma abordagem possivelmente mais promissora. Os principais regimes desenvolvidos para o tratamento do melanoma maligno foram o BOLD (Bleomicina, Vincristina, Lomustina e Dacarbazina), a CVD (Cisplatina, Vinblastina e Dacarbazina) e o Dartmouth (Dacarbazina, Cisplatina, Carmustina e Tamoxifeno) (LUKE; SCHWARTZ, 2013). Entretanto, com o aprofundamento dos estudos clínicos, algumas combinações não demonstravam diferença significativa quando comparadas à DAC sozinha em relação ao aumento da sobrevida dos pacientes (CHAPMAN et al., 1999).

Com o avanço das pesquisas, a habilidade de linfócitos T reconhecerem e destruírem células apresentadoras de antígeno trouxe à luz uma nova abordagem terapêutica dentro do campo da oncologia (SCHATTON et al., 2013). O desenvolvimento da imunoterapia contra o melanoma se iniciou com os benefícios do Interferon alfa (INF- α) e da Interleucina-2 (IL-2) em combinação com regimes de quimioterápicos. Contudo, apesar das respostas ao tratamento preliminarmente apresentarem taxas promissoras em diversos regimes quimioimunoterapêuticos, mais uma vez nenhum deles ao longo dos anos conseguiu resultar em melhora na taxa de sobrevida dos pacientes com melanoma, quando comparados apenas à DAC, nem em melhora nos níveis de toxicidade (ATKINS et al., 2008; IVES et al., 2007; LEGHA et al., 1996; WILSON; SCHUCHTER, 2016).

Segundo os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) em Oncologia fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), a combinação terapêutica utilizada no tratamento do melanoma no Brasil tem sido o esquema de Cisplatina, DAC, Vimblastina, IL-2 e IFN. O protocolo relata que a taxa de resposta a esse tratamento chega a 50% dos pacientes, dos quais 6% apresentam uma sobrevida prolongada em cerca de um ano a mais. Entretanto, os pacientes que têm a oportunidade de receber essa combinação são refinadamente selecionados devido à elevada complexidade da administração desse tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O PCDT ainda ressalta que nenhum medicamento nem combinação terapêutica comercializado no Brasil aumentou as taxas de sobrevida global de maneira comprovada nos casos de melanoma metastático, apesar dos efeitos paliativos atingidos. Assim como nenhum tratamento demonstrou ser mais eficaz do que a DAC, tendo a Temozolomida, um equivalente oral da DAC, sido igualmente eficaz, porém possui um custo muito maior, não sendo recomendada pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WILSON; SCHUCHTER, 2016).

Por outro lado, o imunoterápico mais recentemente desenvolvido, chamado Ipilimumab (IPI), é um anticorpo monoclonal (mAb; do inglês: *monoclonal antibody*) IgG1 capaz de bloquear um inibidor de células T, o antígeno-4 associado a linfócitos (CTLA-4; do inglês: *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*) (O'DAY; HAMID; URBA, 2007; ROBERT; GHIRINGHELLI, 2009). A combinação terapêutica do IPI com a DAC tem apresentado melhores resultados em comparação ao tratamento de DAC com placebo, por reduzir os efeitos colaterais gastrointestinais e de toxicidade no fígado e ainda apresentar efeitos antitumorais mais duradouros (ROBERT et al., 2011).

A posição do Ministério da Saúde brasileiro, através do PCDT, não recomenda o uso do IPI para pacientes com melanoma disseminado, devendo ser submetido à Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (Conitec) no SUS quando houver mais evidências acerca do medicamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O Nivolumab é outro anticorpo mAb que tem recebido destaque para o tratamento moderno dos melanomas malignos. É uma IgG4 que bloqueia o receptor de morte programada conhecido como PD-1, não só em melanoma, mas também em tumor renal e de pulmão (TOPALIAN et al., 2012). Como o PD-1 contribui para o desgaste das células T e o CTL-4 inibe a ativação dessas mesmas células, pesquisadores decidiram analisar quais os efeitos do bloqueio de ambos na combinação do IPI com o Nivolumab. O resultado foi uma melhora significativa na resposta ao tratamento e na média de sobrevivência quando comparada com as monoterapias isoladas (HASSEL, 2016; WOLCHOK et al., 2013).

Outras combinações mais robustas apresentaram resultados promissores, mas que ainda precisam ser aprofundados, como o regime associando o mAb Bevacizumab do Fator de Crescimento Endotelial Vascular – A (VEGF; do inglês: *Vascular Endothelial Growth Factor*), com a intenção de dificultar o estabelecimento da angiogênese, com quimioterápicos como a Carboplatina e o Paclitaxel, (PEREZ et al., 2009).

Nas situações em que é possível identificar que a causa do melanoma é oncogênica, terapias mais direcionadas têm sido aplicadas, alcançando resultados significativamente notáveis. No caso da mutação somática mais comum, o BRAF^{V600E}, o Vemurafenib tem como mecanismo de ação induzir o arraste celular, culminando com a morte por apoptose das células tumorais de melanoma (IVANOV; HEI, 2015). Tal imunoterápico já demonstrou em estudos de fase clínica avançados que sua associação com a DAC reduziu o risco de morte em 74% dos pacientes comparado ao tratamento da DAC com um placebo, além de um perfil tóxico dentro dos padrões determinados pela agência reguladora americana, a FDA (do inglês: *Food and Drug Administration – USA*) (BOLLAG et al., 2010; YOUNG; MINCHOM; LARKIN, 2012). A posição do Ministério da Saúde frente ao Vemurafenib é a mesma relatada para o IPI no PCDT (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

É inegável a evolução dos tratamentos frente à complexidade do melanoma ao longo do tempo, mas infelizmente a realidade é que a resistência tumoral das células que caracterizam esse câncer permanece por superar todas as estratégias terapêuticas, aumentando os números de reincidência e morte por metástase (IVANOV; HEI, 2015). Na realidade, esses tratamentos, especialmente os mais modernos, têm sua possibilidade de sucesso de fato nos casos onde o paciente não foi sensibilizado por nenhuma outra terapia ainda, ao passo que ainda não se tem

conhecimento suficiente sobre as taxas de recidivas e resistência desta população (FRANCHINO; RUDÀ; SOFFIETTI, 2018; GALLI et al., 2019).

Sabe-se que as células mais agressivas começam o processo de metástase em torno de cinco anos antes do aparecimento das primeiras lesões. Portanto, os tratamentos atuais específicos para o melanoma são também tentando atingir os processos metastáticos que possam ou não já ter se estabelecido. Infelizmente, o potencial terapêutico destes tratamentos apresentados é diretamente associado ao diagnóstico precoce do tumor, de forma que mesmo o diagnóstico sendo comprovado o mais inicialmente possível, os tratamentos existentes ainda são paliativos dentro da problemática geral da realidade do melanoma maligno.

No cenário da metástase cerebral de melanoma, os agentes mais ativos são a Temozolomida, com resposta terapêutica variando de 6-10% e a Fotemustina (5-25%) (ADDEO et al., 2013; BAI et al., 2016). IPI demonstrou boa atividade contra a metástase cerebral de melanoma, especialmente por não terem provocado eventos adversos neurológicos, juntamente com aumento de sobrevida (KOEBERLE et al., 2016). A combinação terapêutica de IPI com Fotemustina resultou em controle da metástase cerebral em 50% dos pacientes e uma média de aumento de sobrevida em quase 14 meses (DI GIACOMO et al., 2015). Um estudo recente mostrou que mesmo a combinação entre imunoterapia e radioterapia na metástase cerebral de melanoma não tem efeitos significativos no aumento de sobrevida dos pacientes ou na redução de recidivas (GALLI et al., 2019).

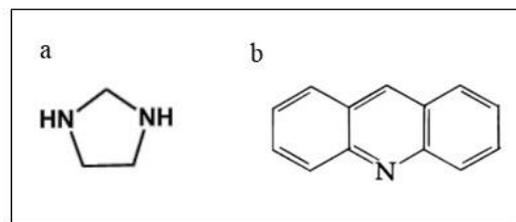
2.5 NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA: O DERIVADO IMIDAZACRIDÍNICO AC05

As imidazolidinas são constituídas por um núcleo heterocíclico contendo átomos de nitrogênio biologicamente ativos e apresentam várias propriedades biológicas confirmadas, tais como anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana, antiparasitária, hipoglicemiante e anticonvulsivo (Figura 10a) (CATERINA et al., 2008; GLEAVE et al., 2010; NEVES et al., 2010; SACZEWSKI; HUDSON; RYBCZYNSKA, 2009; SHARMA; KHAN, 2001).

As acridinas, por sua vez, são derivadas do antraceno por isolamento do carvão de alcatrão, podendo também ser produzidas sinteticamente (Figura 10b). Sua estrutura é formada por três anéis aromáticos, apresentando um átomo de nitrogênio no anel central (CHAGAS, 2016). Atualmente as atividades biológicas conhecidas das acridinas incluem antivirais (SASVARI et al., 2009), anti-malária (GEMMA et al., 2006; JONES et al., 2009), anti-protozoária (EITER et al., 2009), anti-inflamatória (SONDHI et al., 2010), além de também ser usada contra leishmaniose e doença de Chagas (BONSE et al., 1999; GIRAULT et al., 2000).

A atividade antitumoral das acridinas tem sido relacionada à sua capacidade de interagir com o DNA, intercalando-se entre os pares de bases com sua estrutura planar (CHEN et al., 2015; GHOSH et al., 2010; JANOČKOVÁ et al., 2015). O derivado imidazacridínico AC05 ($C_{17}H_{11}N_3OS$), foi sintetizado no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (LAFAYETTE et al., 2013) e sua atividade antitumoral foi inicialmente investigada contra tumores de mama (CHAGAS, 2016). Dados os resultados potencialmente promissores, e sendo mama um tipo de câncer com sítio metastático comum ao melanoma, o cérebro, o AC05 foi escolhido para ter sua atividade antineoplásica avaliada contra linhagens de melanoma.

Figura 10. Estrutura das (a) imidazolidinas e (b) acridinas.



Fonte: (a) (CHAGAS, 2016); (b) (GALDINO-PITTA et al., 2013).

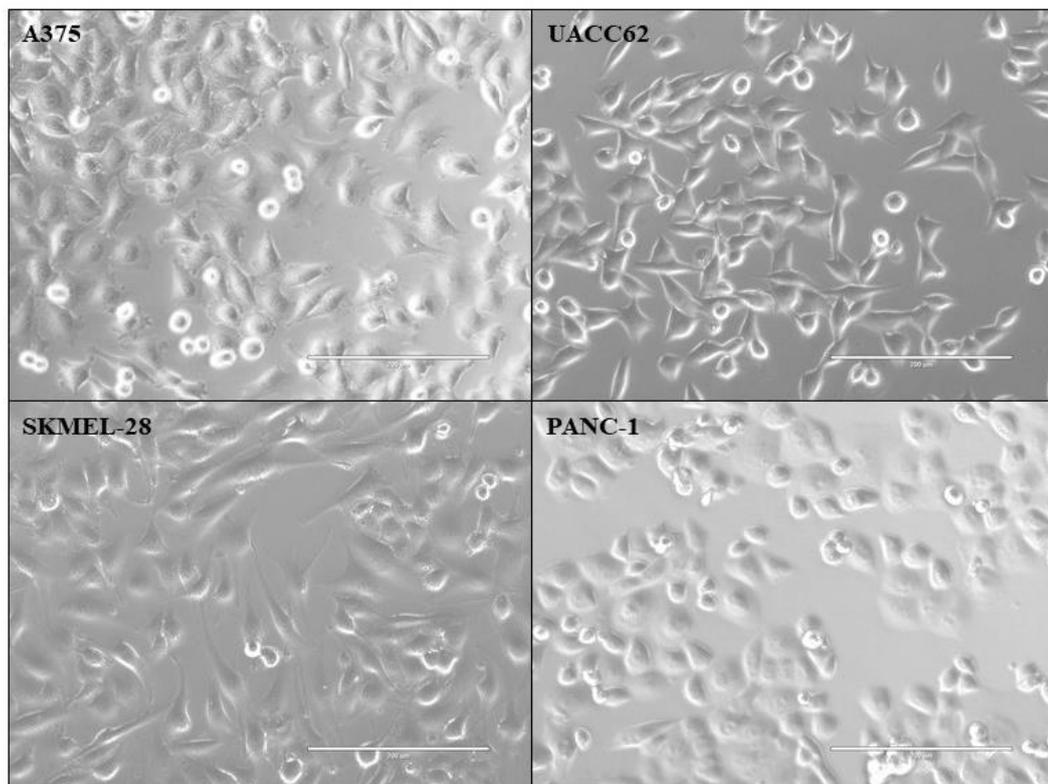
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO DAS LINHAGENS TUMORAIS *IN VITRO*

As linhagens de melanoma cultivadas foram a SKMEL-28 (Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ), a A375 (BCRJ) e a UACC62, sendo esta última gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Roger Chammas, do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). As três linhagens foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Dulbecco's) High Glucose suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% (meio completo), além de penicilina/streptomicina (100 IU/100 µg/L) e 1.2g de bicarbonato de sódio, e mantidas em garrafas ou placas de cultura a 37 °C e 5% de CO₂ até atingirem 70% de confluência.

Também foi cultivada a linhagem PANC-1 (BCRJ), de câncer pancreático, como controle negativo para o estabelecimento do modelo de metástase cerebral, dado que esse tumor primário não tem incidência de metástase no cérebro (Figura 11). Todas as células foram regularmente testadas contra micoplasma, não havendo nenhuma contaminação nos resultados expostos no presente trabalho.

Figura 11 – Linhagens tumorais de melanoma e pâncreas cultivadas em meio completo com SFB a 10% em contraste de fase. Objetiva 20x.



Fonte: Própria autora.

As três linhagens de melanoma compartilham algumas características em comum como serem capazes de metastatizar e possuírem o BRAF como um dos genes mutantes. Contudo, diferem em morfologia e velocidade de proliferação. A SKMEL-28 possui um tamanho maior que as outras duas linhagens e uma morfologia mais estrelada. A A375 possui uma morfologia mais poligonal, prolifera formando mini-colônias e com maior densidade de grânulos no seu citoplasma, além de apresentar a maior velocidade de proliferação entre as três. A UACC62 apresenta um formato mais alongado com os grânulos presentes de forma bipolar (Figura 11).

3.2 ESTABELECIMENTO DO MODELO DE METÁSTASE CEREBRAL DE MELANOMA *IN VITRO*

3.2.1 Animais

Foram selecionados ratos albinos neonatos com até 3 dias de nascimento da linhagem Wistar, sem preferência de sexo, para o estabelecimento das culturas primárias cerebrais corticais mistas.

Os animais foram criados no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, com livre acesso à dieta e à água. Todos os animais utilizados no estudo foram oriundos do processo de redução de ninhada, os quais já seriam sacrificados pelos responsáveis da secção de criação do respectivo biotério. Os aspectos éticos estão descritos no item 5.5.

3.2.2 Culturas de células cerebrais primárias corticais mistas

Os animais neonatos foram sacrificados para isolamento da cabeça e, em seguida, do cérebro. O córtex cerebral foi dissecado, a meninge removida e as estruturas mantidas em um Tampão Salina Fosfato (PBS; do inglês: *Phosphate Buffer Saline*) suplementado com Glicose a 0,6% (PBS-Glicose) autoclavado. O tecido foi dissociado em tubo falcon de 15ml através de pipetagem. Após a centrifugação das células livres em suspensão, a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado meio DMEM-F12 (Gibco) suplementado com SFB a 10%, glicose (33 mmol/L), glutamina (2 mmol/L), penicilina/streptomicina (100 IU/100 µg/L) e bicarbonato de sódio (3 mmol/L) (DE VELLIS; COLE, 2012).

As células foram contadas em câmara de Neubauer, distribuídas de acordo com os ensaios específicos e mantidas em meio completo (DMEM/F12 + SFB 10%) na estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Após dois dias, na primeira troca de meio, as células foram suplementadas com meios e soros respectivos de cada tipo celular, 1:1, a saber: DMEM/F12, já discriminado acima, com SFB 10%, especificamente para os astrócitos, e Neurosabal (Thermo) suplementado com B27 (Thermo) 1%, especificamente para os neurônios. Esse processo se

repetiu nas trocas de meio a cada dois dias, onde era retirado 50% do meio antigo e adicionado 50% de meio novo, composto de DMEM-F12 e Neurobasal, e seus respectivos soros, na proporção 1:1, até maturação das células e confluência em torno de 70-80%.

3.2.3 Isolamento dos astrócitos corticais

As células de cultura primária mista mantidas em garrafas de 25cm², ao atingir 80 a 90% de confluência, foram tripsinizadas para deaderência do fundo da garrafa. O processo consistiu em retirar o meio da cultura, seguindo por lavagem com PBS e EDTA. As células então foram incubadas por 3 a 5 minutos com tripsina, a qual promoveu a suspensão das células anteriormente aderidas ao fundo da garrafa de cultura. A reação foi interrompida pela adição de igual quantidade de volume de meio completo para inativação da tripsina. A solução foi então centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado. Os astrócitos agora isolados foram ressuspensos em meio (DMEM-F12) completo, contados em câmara de Neubauer, redistribuídos de acordo com os ensaios específicos e mantidos em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, havendo troca do meio a cada 2 dias (DE OLIVEIRA BARROS et al., 2014).

3.2.4 Estabelecimento dos parâmetros experimentais

Com a finalidade de que os resultados obtidos fossem de fato efeito da interação celular entre os dois tipos de tecidos diferentes, seja direta (através de co-cultura) ou indiretamente (através do meio condicionado, composto por fatores liberados pela respectiva cultura de células), o presente estudo viu a necessidade dos ensaios serem desenvolvidos com o SFB reduzido a mínimas condições possíveis (0,5%), dada sua composição altamente indutora de proliferação celular.

Assim, foram feitos ensaios qualitativos e quantitativos nas culturas das 4 linhagens tumorais (A375, UACC62, SKMEL-28 e PANC-1) e na cultura primária para avaliar se o meio completo com SFB a 0,5% prejudicaria as células de forma significativa, dentro do período escolhido para análise (24 e 48 horas). Os ensaios qualitativos foram realizados através de imunofluorescência com os marcadores específicos de cada célula para análise de alterações morfológicas.

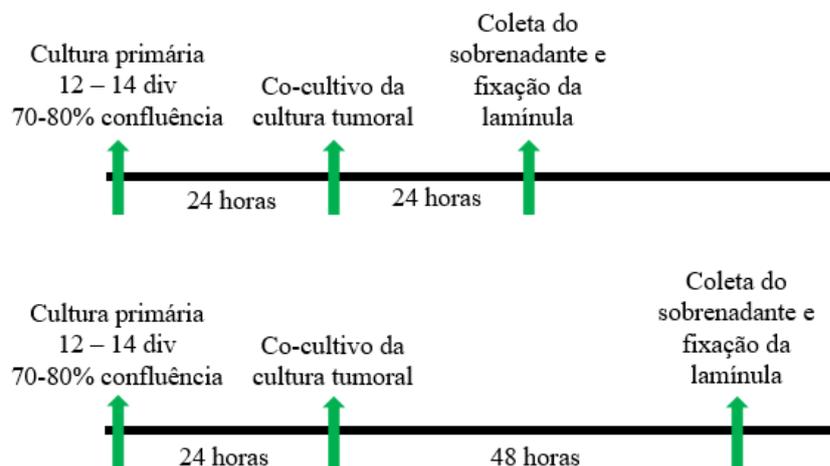
Por sua vez, os ensaios quantitativos foram feitos pela análise de viabilidade celular através da capacidade das células viáveis em reduzir o 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) em cristais de formazan por enzimas mitocondriais. As células foram plaqueadas em pacas de 96 poços a 1x10⁴ células por poço até atingirem confluência de

70-80%. As mesmas foram incubadas com meio de cultura suplementado com SFB nas concentrações 0,5%, 2,5%, 5% e 10%. Após 24 e 48 horas de incubação, foram adicionados 20µL de MTT (5mg/mL) em estufa úmida a 37°C, permanecendo por 3 horas, seguida da incubação de 130µL de Dodecil Sulfato de Sódio 20% (SDS) e armazenamento a TA. A leitura ocorreu 24 horas depois em leitor de microplacas (E1808 – Biotek) a 570nm. Os cálculos foram feitos comparando a viabilidade celular com o SFB a 0,5, 2,5 e 5% à viabilidade celular com SFB a 10% (condição normal de cultivo das células). Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes em culturas independentes, tanto primárias, quanto tumorais.

3.2.5 Co-cultura das linhagens tumorais sobre as células primárias cerebrais corticais mistas ou astrocitárias

Quando as culturas primárias corticais, mistas ou astrocitárias, atingiram 70-80% de confluência, em torno de 12 dias *in vitro*, em poços de placas de 24 poços ou garrafas 75cm², foi iniciado o ensaio da co-cultura de linhagens tumorais sobre as mesmas. As linhagens tumorais (SKMEL-28, A375, UACC62 e PANC-1) foram tripsinizadas, centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos e ressuspensas em meio DMEM-F12 com SFB a 0,5% para contagem na câmara de Neubauer. Foram plaqueadas sobre as culturas mistas ou astrocitárias 6x10⁴ células por poço da linhagem A375, devido sua maior velocidade de proliferação, e 8x10⁴ células por poço das linhagens UACC62, SKMEL-28 e PANC-1 nas placas de 24 poços. Para a obtenção de extrato de proteínas, foram incubadas 3x10⁵ células de A375 e 4x10⁵ células de UACC62, SKMEL-28 e PANC-1 nas garrafas de 75cm², condições também incubadas por 24h e 48 horas. Os poços/garrafas para controle sem o co-cultivo receberam apenas meio completo com SFB a 0,5%. As placas foram encaminhadas para a técnica de imunofluorescência e as garrafas tiveram as proteínas totais extraídas e quantificadas (Figura 12).

Figura 12 – Desenho experimental do ensaio de co-cultura.



Fonte: Própria autora.

3.2.6 Ensaio do meio condicionado de células de melanoma sobre células primárias cerebrais corticais mistas ou astrocitárias

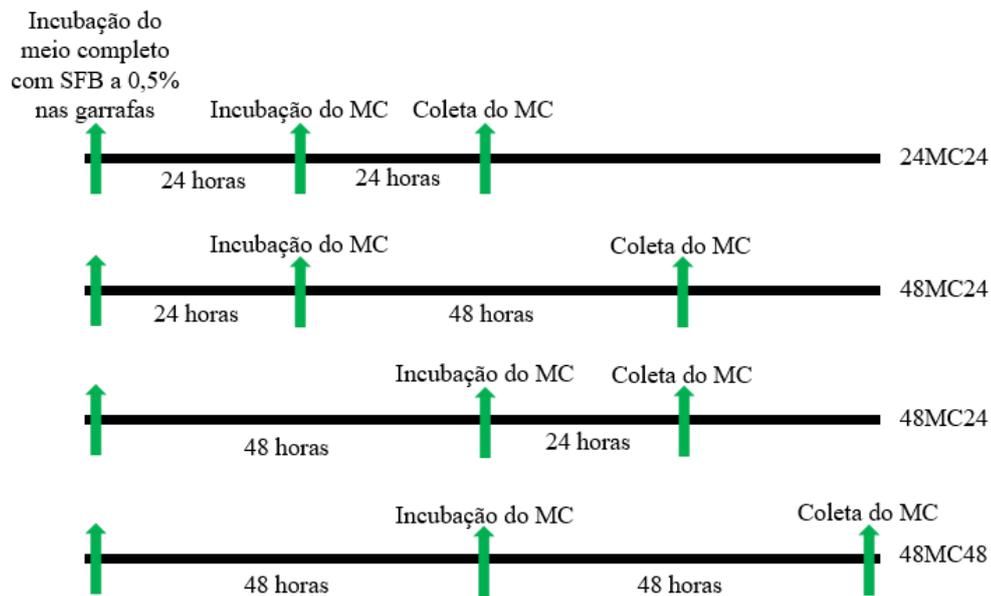
Quando as culturas de células tumorais em garrafas 25cm² atingiram 70% de confluência, elas foram lavadas com meio sem soro e incubadas com DMEM High ou Low Glicose com SFB a 0,5%. Após 24 (MC24h) ou 48 horas (MC48h) de incubação, o sobrenadante das células tumorais foi coletado, centrifugado a 800g por 3 minutos (DE OLIVEIRA BARROS et al., 2014), filtrado e ressuspenso em novo meio completo DMEM-F12 com SFB 0,5%. Este novo meio com SFB a 0,5% foi chamado a partir de agora de meio condicionado (MC), por conter, após o período proposto, fatores liberados especificamente pelas células em questão.

Este MC, foi então redistribuído sobre culturas primárias mistas ou astrócitos cultivados previamente em placas de 24 poços, com 70-80% de confluência. O ensaio teve duração de mais 24 (24MC24 e 24MC48) ou 48 horas (48MC24 e 48MC48). Tempo após o qual as culturas nas placas foram encaminhadas para imunofluorescência (Figura 12). Em todas as condições existiram controles que não receberam o MC, mas nos quais as culturas receberam novo meio completo com SFB a 0,5%.

3.2.7 Ensaio do meio condicionado de células primárias cerebrais corticais mistas ou de astrócitos sobre as linhagens tumorais

Quando as culturas de células primárias mistas ou astrócitos em garrafas de cultivo atingiram 70% de confluência, elas foram lavadas com meio sem soro e incubadas com DMEM-F12 com SFB 0,5%, por 24 e 48 horas, sendo também centrifugado e filtrado. O ensaio ocorreu como descrito no item anterior, sendo que o MC desta vez foi oriundo das culturas primárias ou dos astrócitos e colocado sobre as linhagens tumorais com 70% de confluência, após terem sido previamente plaqueadas em placas de 24 poços para imunofluorescência ou garrafas para extração protéica (Figura 13).

Figura 13 – Desenho experimental do ensaio do meio condicionado. O MC foi produzido após 24 (MC24) ou 48 horas (MC48) sobre cada linhagem (tumoral ou cerebral primária). O MC foi então coletado, centrifugado e filtrado para então ser incubado sobre a outra linhagem (tumoral ou cerebral primária), onde ficou por mais 24 ou 48 horas. Por exemplo, o MC que ficou sobre determinada linhagem por 48 horas é denominado MC48, e o mesmo pode ficar incubado sobre outra linhagem por 24 horas (24MC48) ou por 48 horas (48MC48).



Fonte: Própria autora.

3.2.8 Imunofluorescência

As culturas primárias e astrócitos isolados foram plaqueados em placas de 24 poços a 2×10^5 células por poço, sobre lamínulas redondas estéreis tratadas com poly-l-lysine ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich) para aderência. Após a confluência atingida e os ensaios de co-cultura ou meio condicionado de tumorais sobre as culturas mistas ou astrócitos, as células foram fixadas com solução fixadora composta por Metanol e Acetona 1:1, por 10 minutos a -20°C .

As lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS por 10 minutos, para retirar o excesso da solução fixadora e o bloqueio dos sítios inespecíficos ocorreu através da incubação com Tampão Fosfato Salina (PBS) / BSA 5% por 2 horas à TA. As células foram incubadas com o anticorpo primário diluído em solução bloqueio (1:300), *overnight*, em câmara úmida a 4°C .

Posteriormente, foram feitas 5 lavagens de 3 minutos com PBS/BSA 0,5% e incubação com os anticorpos secundários fluorescentes (1:500) diluídos em solução bloqueio por 2 horas, à TA, em câmara úmida e protegidos da luz. Após lavagens com PBS/BSA 0,5%, foi feita a marcação do núcleo celular com o DAPI (do inglês: *4',6'-diaminido-2-phenylindole* - 1:1000) e/ou de filamentos de F-actina com Faloidina Rodamina (1:200), por 20 minutos. Foram realizadas mais 5 lavagens de 3 minutos com PBS/BSA 0,5% para a montagem das lamínulas com glicerol 30% em PBS e selagem com esmalte. A aquisição das imagens de fluorescência,

em objetivas de 20x e 40x, foi realizada no microscópio EVOS FL Auto (Life Technologies) após secagem.

Os anticorpos primários utilizados foram α -GFAP (BosterBio) para marcação de astrócitos; α - β -Tubulina III (Sigma-Aldrich) para marcação de neurônios e células de melanoma; α -MITF (BosterBio) e α -BRN2 (Sigma-Aldrich), fatores de transcrição para marcação nuclear de células de melanoma; α -Nestina (Cusabio) para identificação de células-tronco neurais; α -PAR-4 (Cusabio) como marcador de supressão tumoral; e α -KI67 (BosterBio) como marcador de proliferação celular. Os anticorpos secundários utilizados foram o Alexa Fluor 488 goat α -rabbit IgG (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), o Alexa Fluor 633 goat α -Mouse (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

3.2.9 Contagem de células MITF+ e BRN2+

A partir da imunofluorescência, foi feita a contagem de células de melanoma positivas para MITF e para BRN2 nas co-culturas sobre células mistas e sobre astrócitos isolados, com o intuito de identificar possíveis influências dessas células isoladas ou do conjunto do microambiente sobre a expressão desses fatores de transcrição. Foram fotografados 10 campos por condição analisada em duplicata de lâmina e em três experimentos independentes. As fotos foram feitas em objetivas de 40x.

No programa ImageJ, através de um *plugin* para contagem de células, foi feita a contagem dos núcleos marcados pelo DAPI e que estavam co-marcados com β -Tub III, identificando-os como células de melanoma e não neuronais primárias. Em seguida, foi feita a marcação dos núcleos marcados para MITF ou BRN2 e que também eram co-marcados com β -Tub III. As contagens foram feitas nas linhagens isoladas, para avaliação da expressão basal, nas co-culturas de 24 e 48 horas, bem como nas linhagens de melanoma expostas ao MC de células primárias mistas e astrocitárias.

3.2.10 Proliferação celular das linhagens tumorais com meio condicionado de células primárias

As linhagens tumorais foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio completo para aderência. Após 24 horas, o meio completo foi retirado e as células foram incubadas com MC de células mistas ou de astrócitos isolados, produzidos por 24 ou 48 horas (MC24h e MC48h), ou com novo meio completo, sendo todas as condições em triplicata. Após mais 24 ou 48 horas, o meio foi retirado, as células foram tripsinizadas, marcadas com azul de trypan e contadas em câmaras de Neubauer as células viáveis.

3.2.11 Migração celular das linhagens tumorais com meio condicionado de células primárias

As linhagens tumorais foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio completo para aderência. Quando as células atingiram a confluência entre 90-100%, foram feitos dois riscos em forma de cruz no fundo dos poços, seguido de duas lavagens com PBS estéril para retirada das células soltas após os riscos. As células foram então incubadas com o MC de células mistas ou de astrócitos isolados, produzidos por 24 ou 48 horas (MC24h ou MC48h), ou com novo meio completo, sendo todas as condições em triplicata. As células foram então fotografadas no tempo 0 hora para registro da área livre inicial. Após 24 horas, as células foram fotografadas novamente para registro das novas áreas livres.

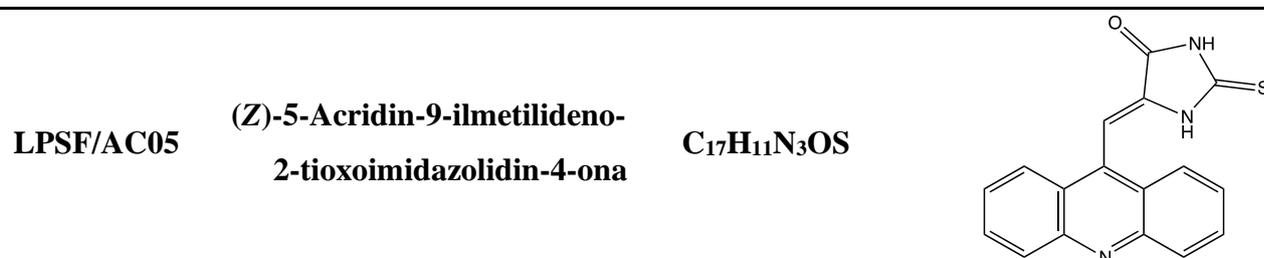
No programa ImageJ, as imagens foram transformadas para fundo preto e, através de uma ferramenta específica, as áreas livres foram calculadas nos tempos 0 e 24h. No Excel e GraphPad, foi possível calcular a porcentagem de variação entre as áreas livres dos diferentes tempos analisados.

3.3 DERIVADO IMIDAZACRIDÍNICO AC05

O AC05 (C₁₇H₁₁N₃OS) foi sintetizado pelo LPSF (LAFAYETTE et al., 2013) (Figura 14). A citotoxicidade do AC05 foi testada previamente contra células mononucleares do sangue periférico (PBMC; do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) oriundas de voluntários saudáveis, no trabalho de Chagas, 2016.

Os testes *in vitro* e *in vivo* do AC05 na cultura primária mista e nas três linhagens de melanoma foram desenvolvidos durante missão científica no ICESP-FMUSP, no laboratório de Oncologia Experimental, sob a coordenação do Prof. Dr. Roger Chammas.

Figura 14 – Derivado imidazacridínico desenvolvido pelo LPSF.



Fonte: (LAFAYETTE et al., 2013)

3.3.1 Avaliação da citotoxicidade do composto por MTT

A avaliação da citotoxicidade do derivado imidazacridínico AC05 sobre as linhagens tumorais e de cultura primária foi feita através do ensaio do MTT, como descrito no item 5.2.4. As células foram distribuídas em placas de 96 poços na proporção de 1×10^4 células por poço, no caso da A375, $0,5 \times 10^4$ células por poço, no caso da SKMEL-28 e da UACC62, e 1×10^5 no caso da cultura primária mista, e mantidas por 24 horas a 37° graus e 5% de CO₂.

O composto previamente diluído em Dimetilsulfóxido (DMSO 0,1%) a 50mM foi diluído em meio completo com SFB 10%, nas concentrações de 1, 10, 50 e 100µM e incubado em triplicata sobre as células. Como controles foram utilizadas a célula tratada com o veículo (DMSO 0,1%) e a célula sem tratamento. As mesmas condições foram repetidas em uma placa denominada “branco”, por conter apenas o meio completo com SFB a 10%, sem nenhuma célula. Após 24 e 48 horas, houve a incubação de 20µL do MTT a 5mg/mL (Sigma-Aldrich), permanecendo durante 3 horas na estufa úmida, seguida da adição de 130µL de SDS a 20% e armazenamento a TA. Após 24 horas, a leitura do experimento foi realizada em um leitor de microplacas (El808 – Biotek) a 570nm.

A partir da obtenção dos valores correspondentes na espectrofotometria, foi utilizado o Office Excel 2010 (Microsoft Corporation) para calcular o efeito do composto sobre a viabilidade celular (%) das células tratadas em relação às células incubadas apenas com o veículo DMSO. Também foi utilizado o Origin Pro 8 (v.8, Originlab Corporation) para calcular a concentração de composto necessária para inibir 50% da população celular *in vitro* (IC₅₀), nos casos em que o composto reduziu a viabilidade celular a menos de 50%.

A partir do IC₅₀ do composto também foi calculado o índice de seletividade (IS), o qual indica a capacidade do composto distinguir a linhagem saudável e a neoplásica, sugerindo se o mesmo tem potencial para testes pré-clínicos *in vivo*. O IS corresponde à razão entre o valor do IC₅₀ de cada composto na cultura de células não-tumorais e na cultura tumoral. O composto foi considerado seletivo com IS>3, ou seja, quando o valor do composto é 3 vezes mais ativo na linhagem tumoral do que nas células saudáveis (ISLAM et al., 2016).

3.3.2 Extração de proteínas e Western blotting

As proteínas totais foram extraídas e quantificadas através do ensaio BCA (do inglês: *Bicinchoninic acid*) (BioRad). 20µg de proteínas por condição foram submetidas à eletroforese no gel SDS-PAGE (12%) e transferidas para membranas PVDF (GE Healthcare Life Sciences). As membranas foram bloqueadas em leite 5%-TBST (do inglês: *Tris-buffered saline*, 0,1%

Tween 20) por 2 horas e então incubadas com os anticorpos primários a 4°C *overnight*. Após 3 lavagens de 10 minutos em TBST, as membranas foram então incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase a temperatura ambiente, por 2 horas, diluído em leite desnatado 5%-TBST. Para revelação foi utilizado o ECL-Plus (GE Healthcare). Os anticorpos primários utilizados foram α -PAR-4 (Cusabio), α -Bcl-2 (Santa Cruz) e α - α -Tubulina (Santa Cruz).

3.3.3 Avaliação da atividade antineoplásica *in vivo*

Foram utilizados camundongos nude balb/c, fêmeas, com 7 semanas de idade, pesando em média 18 gramas, para os testes *in vivo* dos efeitos antitumorais do AC05. Foram inoculadas subcutaneamente 1×10^6 células de UACC62 no flanco esquerdo de cada animal, os quais foram separados randomicamente em dois subgrupos, tratado e não-tratado.

Após cerca de 7 dias, quando metade do “n” amostral (n = 12 / experimento independente) apresentava o tumor palpável, mesmo que ainda não mensurável, iniciou-se a intervenção por gavagem. Os animais foram tratados com AC05 (30mg/kg) ou veículo (carboximetilcelulose – CMC - a 0,2%) durante 5 dias consecutivos, seguidos de 2 dias sem nenhuma intervenção para descanso dos animais, exceto a mensuração do tamanho do tumor. As escolhas do CMC como veículo e da gavagem como técnica foram devido ao fato do AC05 ser um composto apolar e, portanto, não dissolver bem em solventes polares os quais podem ser injetados intraperitonealmente, por exemplo.

A medição do volume tumoral foi feita diariamente, com o uso de um paquímetro manual. Após obtenção dos valores dos diâmetros menor (d) e maior (D), o volume do tumor foi calculado através da fórmula $(d^2 \times D) / 2$. O tratamento de 5 dias por 2 de descanso se repetiu por dois ciclos, após os quais os animais foram devidamente anestesiados e sacrificados e os tumores retirados para imediata pesagem e fixação com paraformaldeído 4%, para posterior imunohistoquímica. O ensaio foi repetido em 3 grupos independentes com n=8 animais por grupo e a análise estatística foi feita através do teste de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) no software GraphPad. Os aspectos éticos estão descritos no item 5.5.

3.3.3.1 Imunohistoquímica de hematoxilina-eosina (HE) nos tumores de melanoma tratados *in vivo*

Os tumores retirados do experimento *in vivo* foram emblocados em parafina, cortados e montados em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram rehidratados progressivamente em três diluições de xilol e de álcool a 100%, 85% e 70% por 5 minutos em cada concentração, seguido

de 2 lavagens por 5 minutos em água destilada corrente e mais uma lavagem por 5 minutos em PBS.

Posteriormente, os cortes foram contra-corados com hematoxilina-eosina por até 10 segundos. Após lavagem com água destilada corrente, os cortes foram desidratados progressivamente em diluições de álcool a 70%, 80%, 90% e 100%, por 3 minutos cada, imersos em xilol por 5 minutos cada e montados com entellan e lamínula.

3.4 TRATAMENTO DA CO-CULTURA DE MELANOMA SOBRE CÉLULAS CEREBRAIS *IN VITRO*

A partir dos resultados do potencial antitumoral do derivado imidazacridínico sobre as linhagens de melanoma, *in vitro* e *in vivo*, objetivou-se analisar o possível efeito antitumoral do AC05 no modelo de metástase *in vitro*, através da co-cultura de melanoma sobre a cultura de células mistas, bem como sobre os astrócitos isolados.

As co-culturas foram tratadas durante 48 horas, dado o tempo de citotoxicidade calculado para as linhagens de melanoma isoladas, na concentração do IC₅₀ encontrado nesse mesmo ensaio. O tempo de co-cultura para iniciar o tratamento também foi de 48 horas, visto que 24 horas ainda poderia ser considerado como um tempo baixo para o estabelecimento das interações entre as diferentes células no co-cultivo. Através da técnica de imunofluorescência, foram analisadas as expressões de KI67 e PAR-4, com o objetivo de analisar a proliferação tumoral e o possível processo apoptótico induzido pelo composto em estudo, respectivamente.

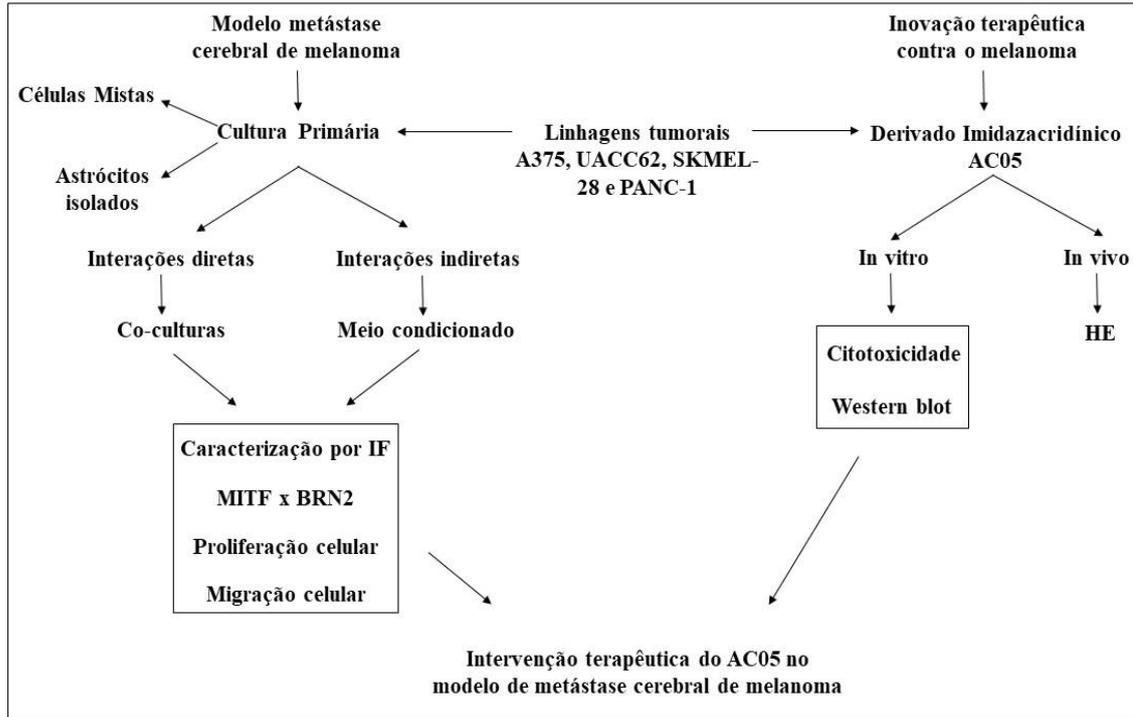
3.5 ASPECTOS ÉTICOS

Os experimentos concernentes à metodologia do modelo de metástase cerebral de melanoma *in vitro* foram todos previamente analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, sob o número de processo 23076.012500/2015-09 (Anexo A). Os experimentos relativos ao tratamento do derivado imidazacridínico AC05 no modelo animal de melanoma foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da USP, sob o número de processo 168/15 (Anexo B).

3.6 FLUXOGRAMA METODOLÓGICO

Abaixo segue um fluxograma resumindo os materiais e métodos utilizados.

Figura 15. Fluxograma metodológico.



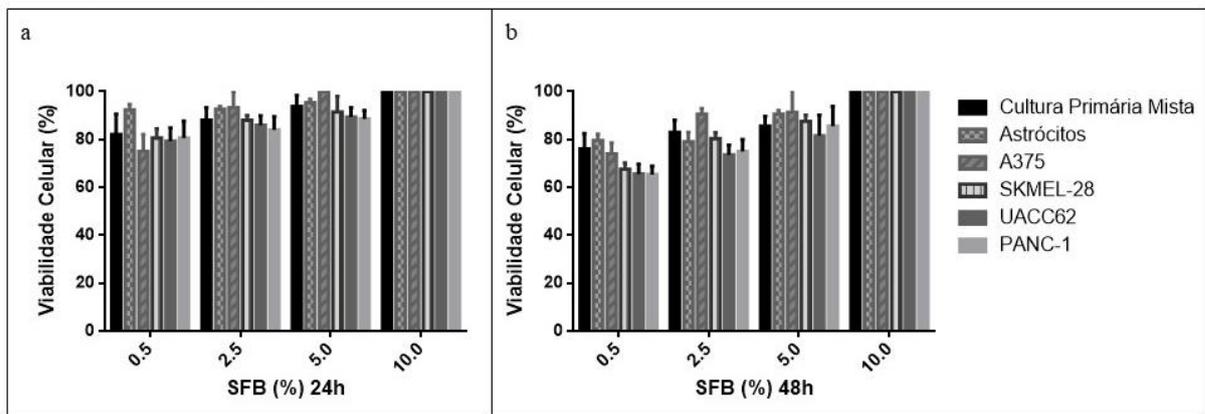
4 RESULTADOS

4.1 ESTABELECIMENTO DO MODELO DE METÁSTASE CEREBRAL DE MELANOMA *IN VITRO*

4.1.1 Viabilidade celular nos parâmetros experimentais estabelecidos

As culturas tumorais e primárias mistas foram submetidas a diferentes concentrações de SFB, de 0,5 a 10% durante 24 ou 48 horas, quando se encontravam em 70-80% de confluência em placas de 96 poços. Nenhuma condição de SFB foi capaz de inviabilizar 50% das células presentes na cultura, nem tumorais nem primária mista. Dessa forma, a condição de SFB a 0,5%, necessária para o estabelecimento do modelo, durante 24 ou 48 horas, foi validada (Figura 16).

Figura 16 – Viabilidade (V) celular por MTT das culturas tumorais e primária mista em diferentes concentrações de SFB (%), comparada à condição de SFB a 10% (V=100%). Nenhuma condição foi capaz de reduzir a viabilidade celular a menos de 50%, em 24 (a) ou 48 horas (b). Ambos os gráficos são representativos de n = 3 experimentos independentes.



4.1.2 Caracterização das linhagens de melanoma em relação aos marcadores celulares

Inicialmente, foi necessário caracterizar os marcadores celulares que seriam utilizados no modelo, a partir das linhagens celulares escolhidas. Os marcadores específicos de células cerebrais como β -Tub III para neurônios e GFAP para astrócitos também foram produzidos pelas linhagens tumorais de melanoma e pancreática (Figura 17). A linhagem A375 expressou ambos os marcadores nas regiões nuclear e perinuclear, enquanto que as demais expressaram os marcadores de forma mais abrangente no citoplasma, como pode-se observar no merge.

Figura 17 – Expressão dos marcadores celulares β -Tubulina III e GFAP pelas linhagens tumorais. Objetiva 40x.

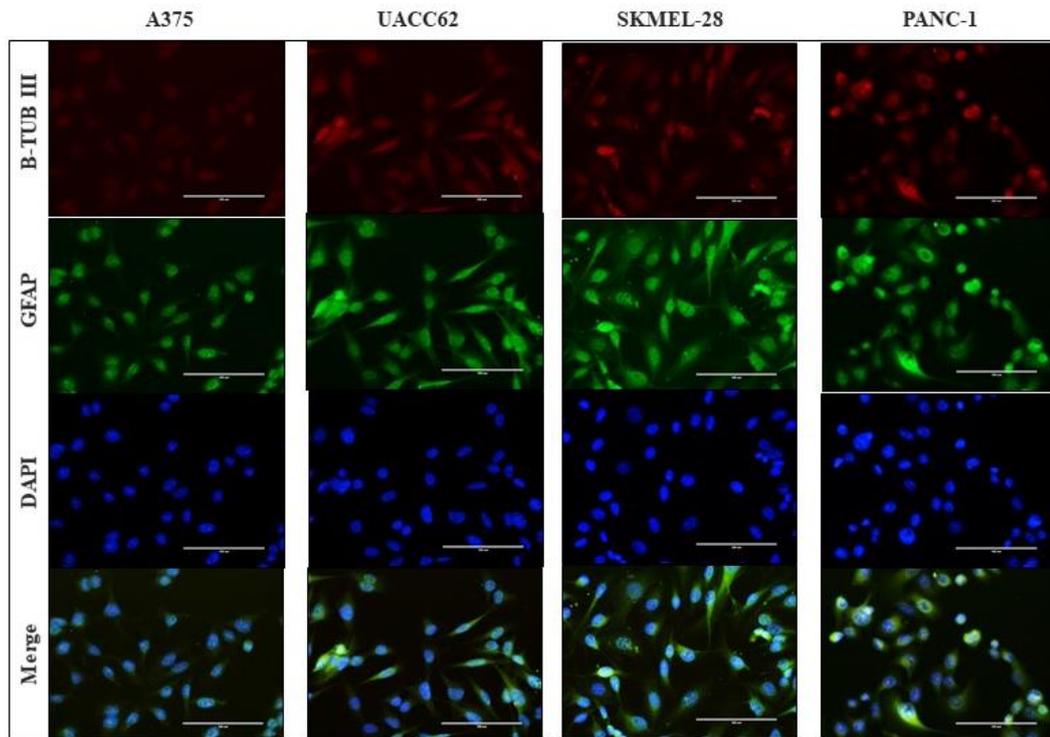
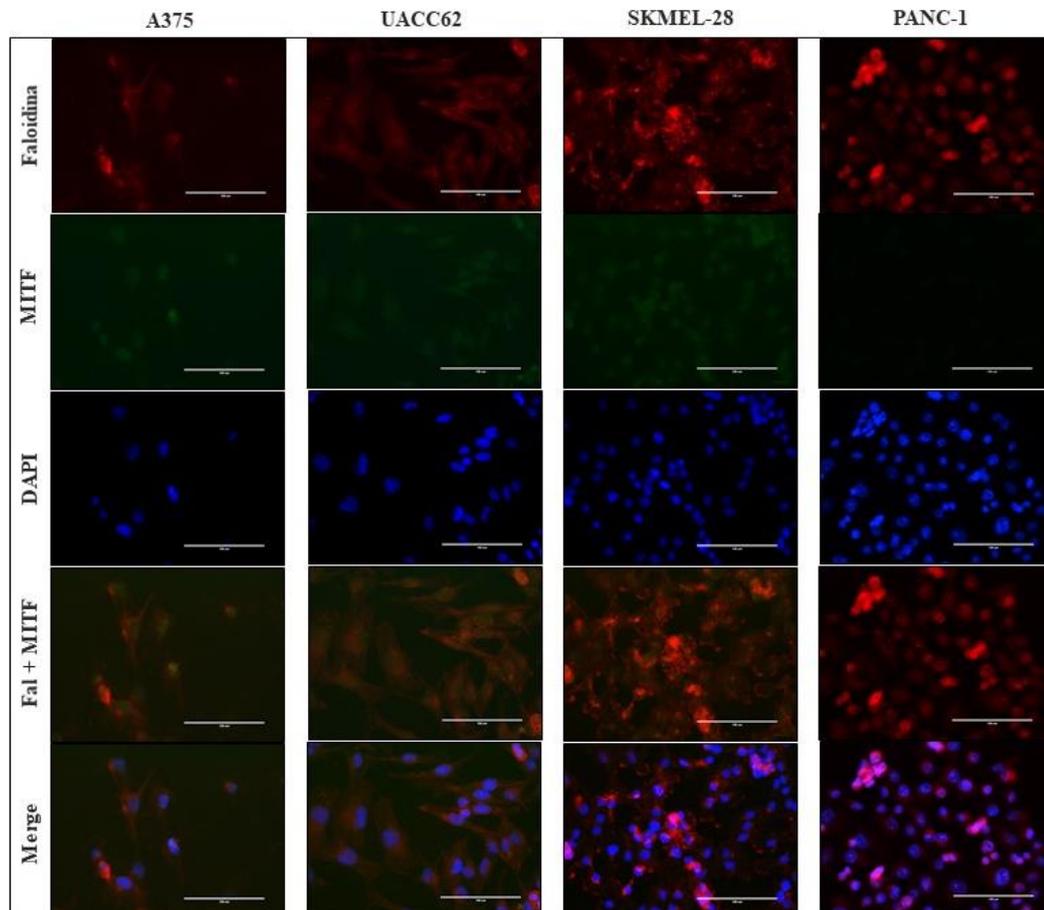
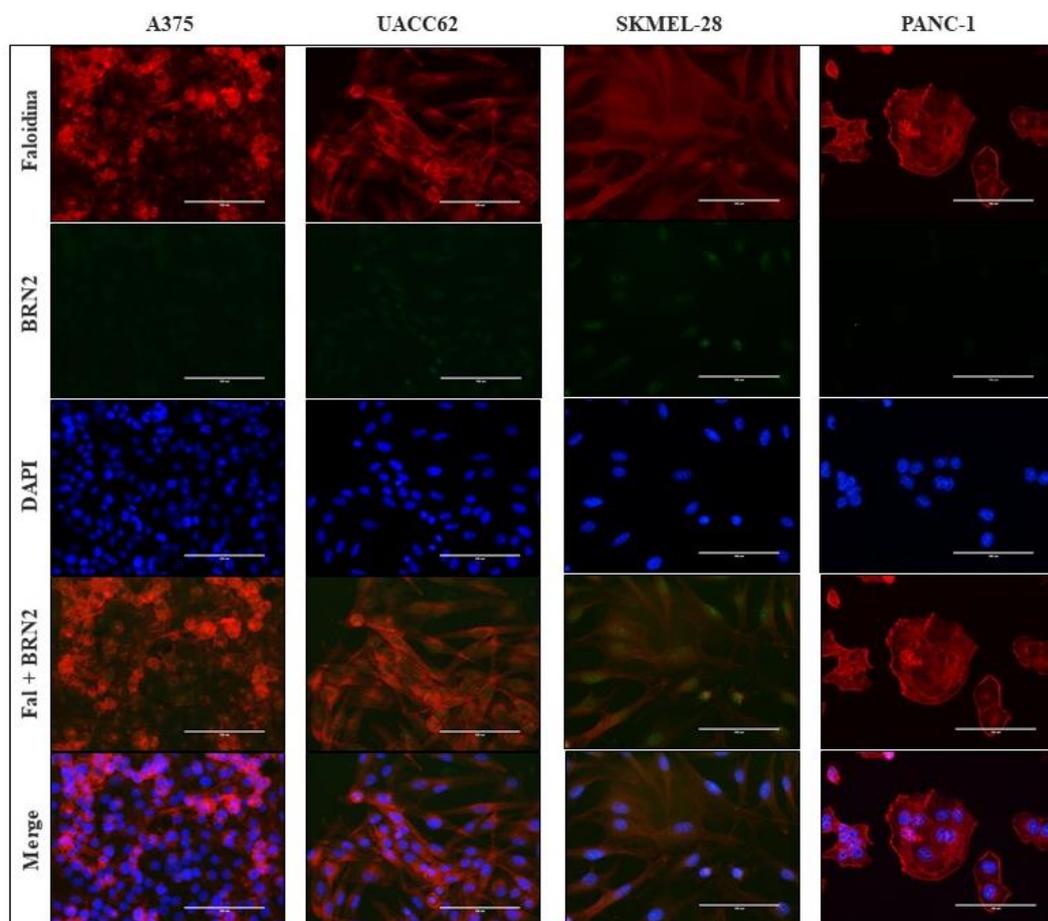


Figura 18 – Expressão do marcador celular MITF específico de melanoma e Faloidina, marcando filamentos de F-actina no citoesqueleto. Objetiva 40x.



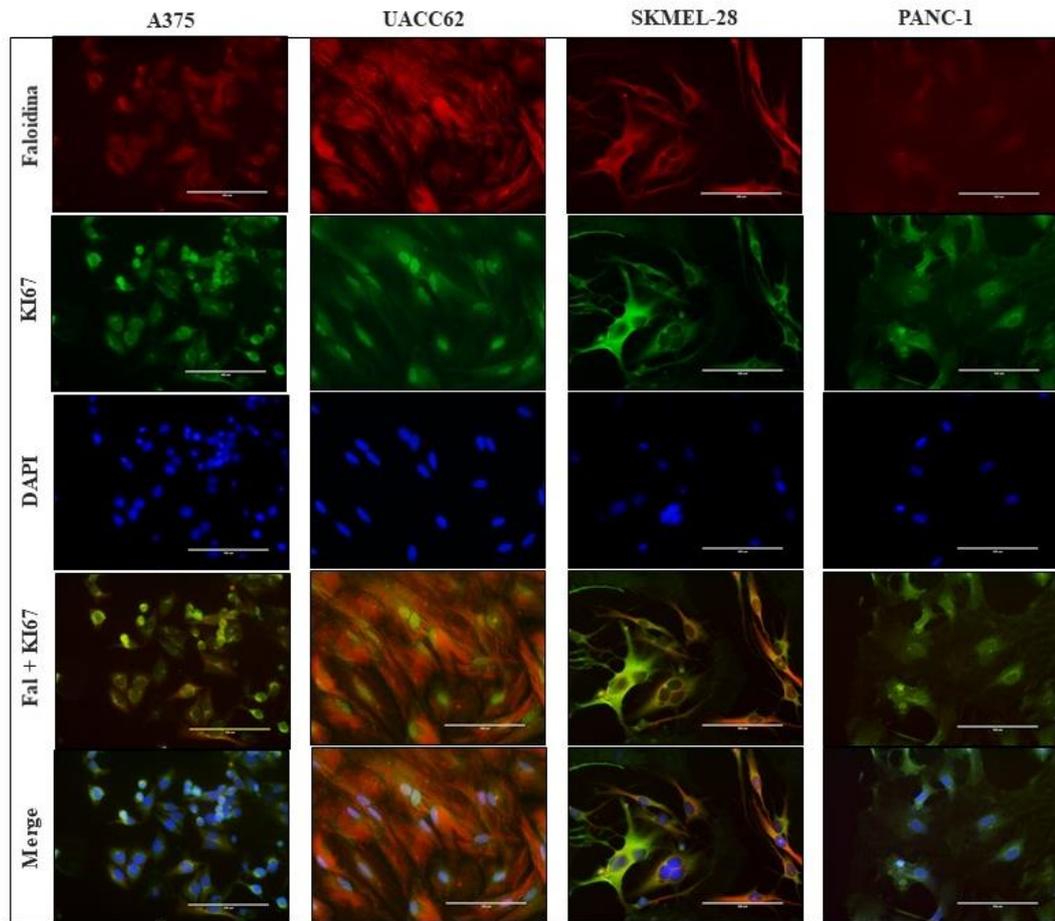
Como descrito na revisão de literatura, os marcadores específicos de melanoma, *Microphthalmia-induced transformation factor* (MITF) e *Brain-2* (BRN2), também foram caracterizados nas linhagens tumorais individuais, onde ambos são expressos no núcleo por serem fatores de transcrição (Figura 18 e 19). Para as marcações de MITF e BRN2 foi utilizado para co-marcação a Faloidina, a qual é expressa pelas fibras de F-actina do citoesqueleto. É importante salientar a marcação menos significativa de BRN2 do que de MITF, de forma basal, pelas células de melanoma. PANC-1, como controle negativo, não expressou nenhum dos dois marcadores, corroborando a especificidade dos mesmos para o melanoma.

Figura 19 – Expressão do marcador celular BRN2 específico de melanoma e Faloidina, marcando filamentos de F-actina no citoesqueleto. Objetiva 40x.



Por outro lado, a proliferação celular, por ser um processo característico de células tumorais, foi expressa de forma significativa pelas quatro linhagens tumorais em estudo, sendo as quatro positivas para KI67 (Figura 20).

Figura 20 – Expressão do marcador proliferativo KI67 pelas quatro linhagens tumorais. Objetiva 40x.



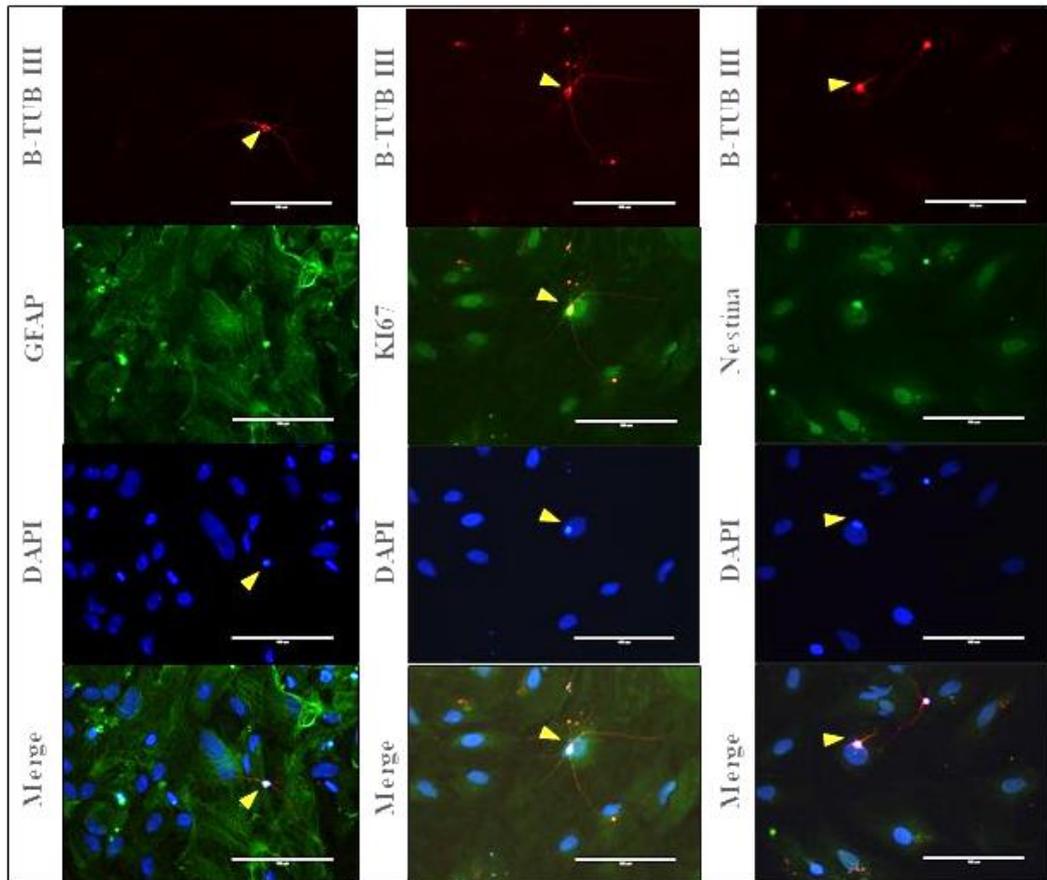
4.1.3 Caracterização do microambiente cerebral como nicho pré-metastático

Após a caracterização dos marcadores celulares das linhagens tumorais isoladas, deu-se a caracterização das culturas primárias isoladas, seja da forma mista, seja apenas os astrócitos isolados.

4.1.3.1 Marcadores celulares da cultura primária mista

Os primeiros marcadores analisados foram a β -Tub III e o GFAP, marcadores citoplasmáticos de neurônios e astrócitos, respectivamente. O marcador KI67, também mostrou que as culturas estavam em estado de proliferação, sem nenhum interferente nesse processo celular, apesar de menos significativa que nas marcações tumorais. A marcação de nestina mostra a presença de potencial de diferenciação das células presentes na cultura (Figura 21).

Figura 21 – Caracterização da cultura primária mista. β -Tubulina III+ indicando presença de neurônios (seta amarela). GFAP e Faloidina marcando as fibras do citoesqueleto dos astrócitos, KI67 como marcador proliferativo e Nestina como marcador de pluripotência. Objetiva 40x.



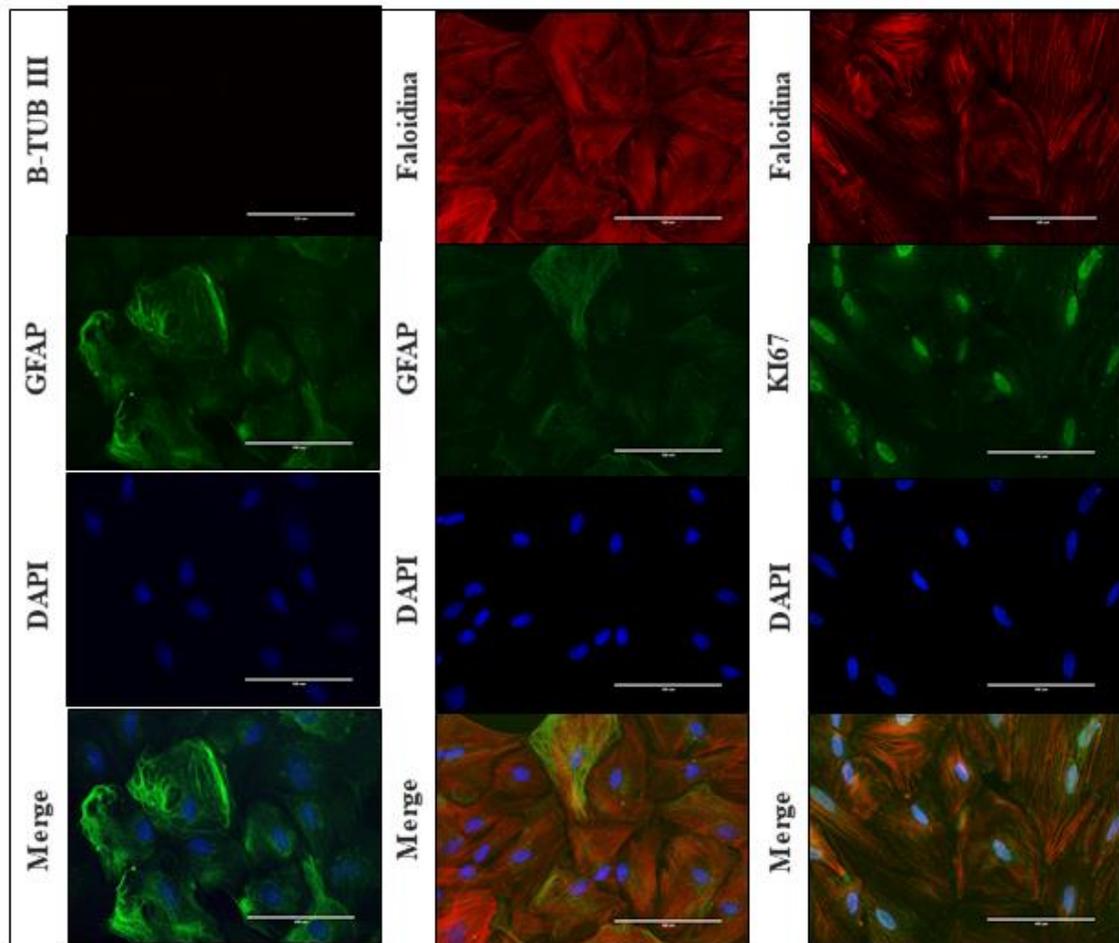
4.1.3.2 Marcadores celulares dos astrócitos isolados

Os astrócitos isolados foram marcados especificamente pelo GFAP e pela Faloidina. A marcação de KI67 também demonstra o comportamento proliferativo normal da cultura em estudo. A ausência de β -Tub III já era esperada, dado que a cultura não apresenta neurônios, bem como também foi vista a ausência do marcador Nestina (Figura 22).

4.1.4 Co-culturas de linhagens tumorais sobre a cultura primária

Dada a caracterização das células isoladamente, deu-se início ao estabelecimento do modelo a partir da co-cultura das linhagens tumorais sobre as células primárias mistas ou sobre os astrócitos.

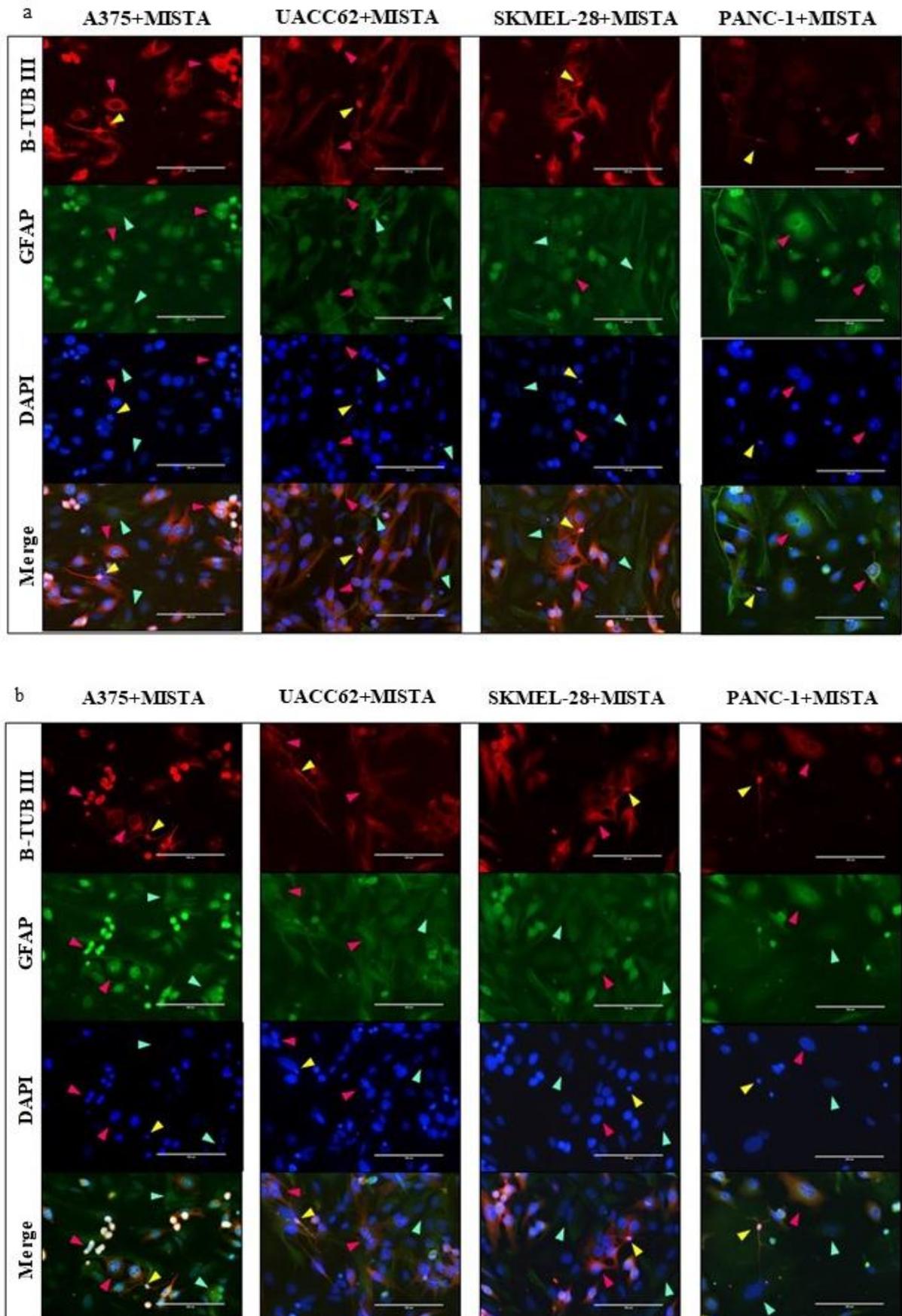
Figura 22 – Caracterização da cultura de astrócitos isolados. β -Tubulina III- indicando ausência de neurônios. GFAP e Faloidina marcando as fibras do citoesqueleto dos astrócitos e o KI67 como marcador proliferativo. Objetiva 40x.



4.1.4.1 Co-cultura das linhagens tumorais sobre as células cerebrais mistas

A primeira caracterização foi com os marcadores β -Tub III e GFAP, dado que ambos são expressos tanto pelas células cerebrais, como pelas linhagens tumorais (Figura 23). Apesar de PANC-1 ter marcado β -Tub III na cultura isolada, na co-cultura, tanto 24 como 48 horas, a marcação dessa proteína é bastante reduzida, comparada à marcação controle. As linhagens de melanoma expressam ambos os marcadores cerebrais, mas com mais ênfase para a β -Tub III, a qual se destaca no merge das imagens. Os marcadores não apresentam diferenças entre 24 e 48 horas de co-cultivo.

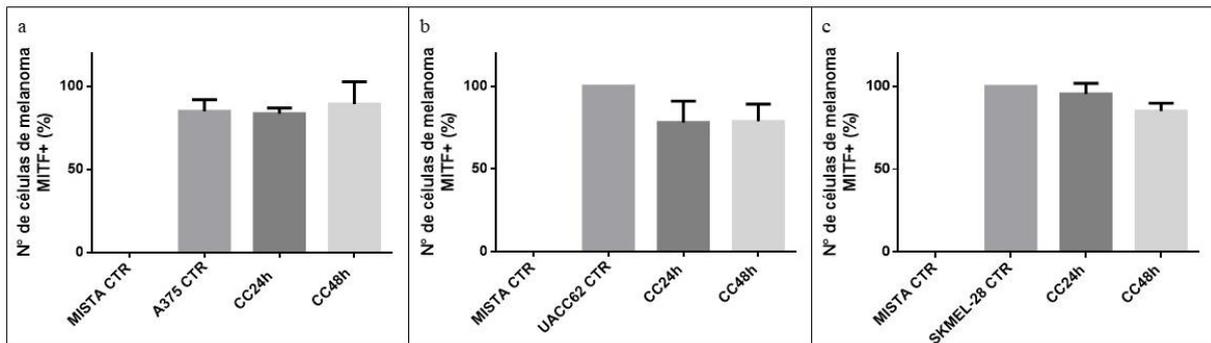
Figura 23 – Expressão dos marcadores citoplasmáticos β -Tubulina III e GFAP pelas linhagens tumorais e pelas células cerebrais mistas. Neurônios na seta amarela; Astrócitos nas setas azuis; e Linhagens tumorais nas células cor de rosa. (a) Co-cultura de 24 horas. (b) Co-cultura de 48 horas. Objetiva 40x.



4.1.4.1.1 Expressão protéica de MITF e BRN2

Foi realizada a contagem de células de melanoma positivas para MITF na co-cultura, em comparação à positividade observada nas linhagens de melanoma isoladas, dado que na metástase a expressão do MITF poderia reduzir frente a um aumento de BRN2. Entretanto, não houve diferença significativa na quantidade de células positivas para MITF nas co-culturas nem em comparação à expressão controle, nem entre os tempos de 24 e 48 horas (Figura 24).

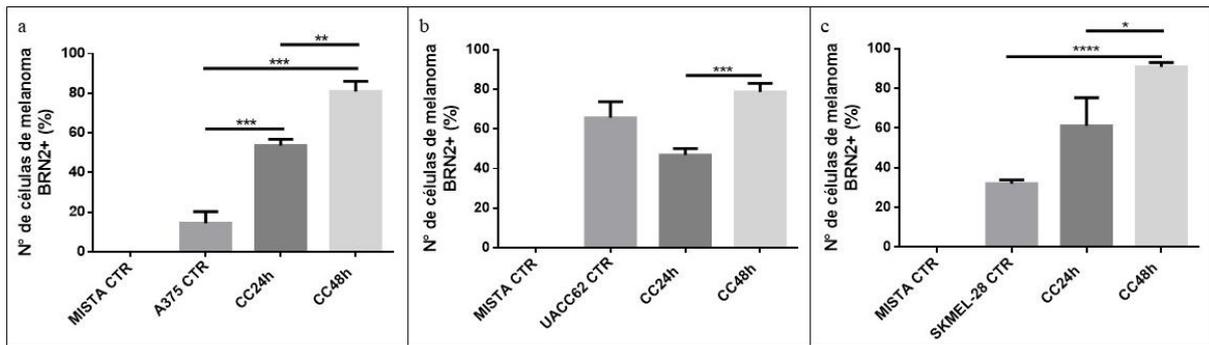
Figura 24 – Número de células de melanoma MITF+ em porcentagem. (a) MITF+ em A375. (b) MITF+ em UACC62. (c) MITF+ em SKMEL-28.



Por sua vez, a contagem de células de melanoma BRN2+ nas co-culturas em células mistas demonstrou um aumento significativo desse marcador de invasividade (Figura 25). Enquanto a A375 de forma basal tinha CTR=14,43±5,86 de células positivas para BRN2, durante 24 horas de co-cultivo, a expressão aumentou para CC24h=53,59±3,23 ($p<0.001$) e, em 48 horas, para CC48h=80,91±5,12 ($p<0.001$) (dados em %).

A UACC62, após uma redução de significância estatística entre o nível basal e as primeiras 24 horas de interações diretas entre as células, demonstrou um aumento da expressão de BRN2 entre 24 e 48 horas de co-cultura, onde a porcentagem de células positivas para esse fator de transcrição foi de CC24h=46,84±3,26 para CC48h=78,67±4,34 ($p<0.001$) (dados em %). Já a SKMEL-28 apresentou um aumento do BRN2 entre os dois tempos de co-cultura, indo de CC24h=61,22±14,17 para CC48h=90,87±2,22 ($p<0.05$), e entre os níveis basais CTR=32,04±1,81 e a CC48h ($p<0.001$) (dados em %).

Figura 25 – Número de células de melanoma BRN2+ em porcentagem. (a) BRN2+ em A375. (b) BRN2+ em UACC62. (c) BRN2+ em SKMEL-28. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.



4.1.4.2 Co-cultura das linhagens tumorais sobre os astrócitos isolados

Nas co-culturas sobre os astrócitos isolados, também analisou-se inicialmente a expressão dos marcadores β -Tub III e GFAP, nas 24 e 48 horas (Figura 26). Observou-se uma redução na marcação de β -Tub III pelas linhagens de melanoma, onde no merge percebemos o destaque da marcação do GFAP nas primeiras 24 horas e a praticamente ausente marcação dessa proteína pela linhagem pancreática. Entretanto, após 48 horas de co-cultivo a marcação de β -Tub III pelo melanoma é recuperada, apesar de ainda não se destacar no merge, diferentemente do observado na marcação da co-cultura sobre as células mistas.

4.1.4.2.1 Expressão protéica de MITF e BRN2

Ao contrário da co-cultura sobre as células mistas, a interação direta apenas com os astrócitos isolados induziu uma redução na marcação de MITF+ pelas células de melanoma das linhagens UACC62 e SKMEL-28 (Figura 27). A redução da expressão de MITF pelas células de UACC62 foi de níveis basais do CTR=99,5 \pm 0,7 para CC24h=87,22 \pm 2,9 ($p < 0.05$) e CC48h=80,4 \pm 4,74 ($p < 0.01$) (dados em %). Na SKMEL-28 a redução ocorreu apenas entre os níveis basais e a co-cultura mais tardia, indo de CTR=100% para CC48h=83,38 \pm 0,8 ($p < 0.001$) (dados em %).

Figura 26. Expressão dos marcadores citoplasmáticos β -Tubulina III e GFAP, pelas linhagens tumorais e pelos astrócitos, respectivamente. Astrócitos nas setas azuis; e Linhagens tumorais nas células cor de rosa. (a) Co-cultura de 24 horas. (b) Co-cultura de 48 horas. Objetiva 40x.

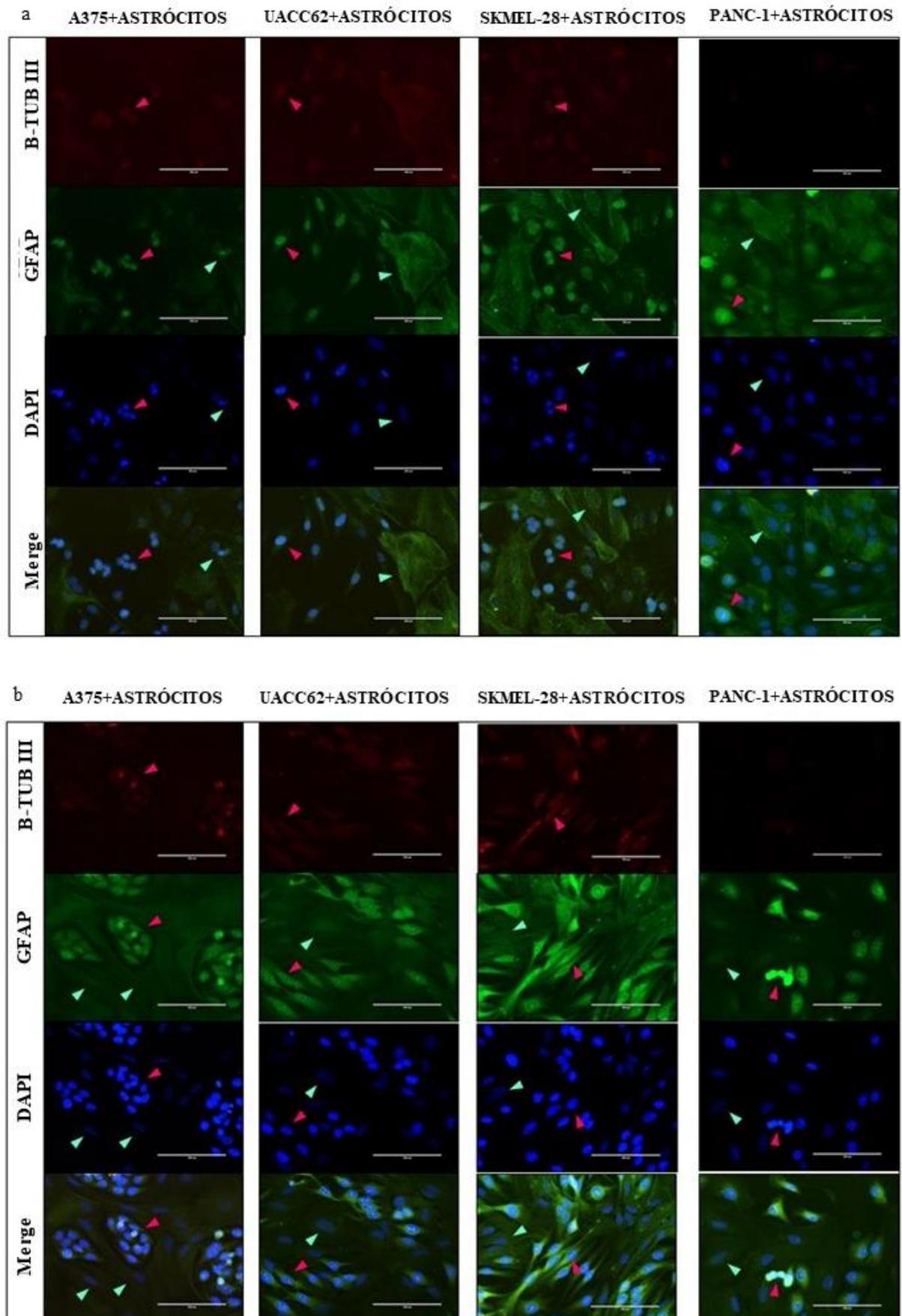
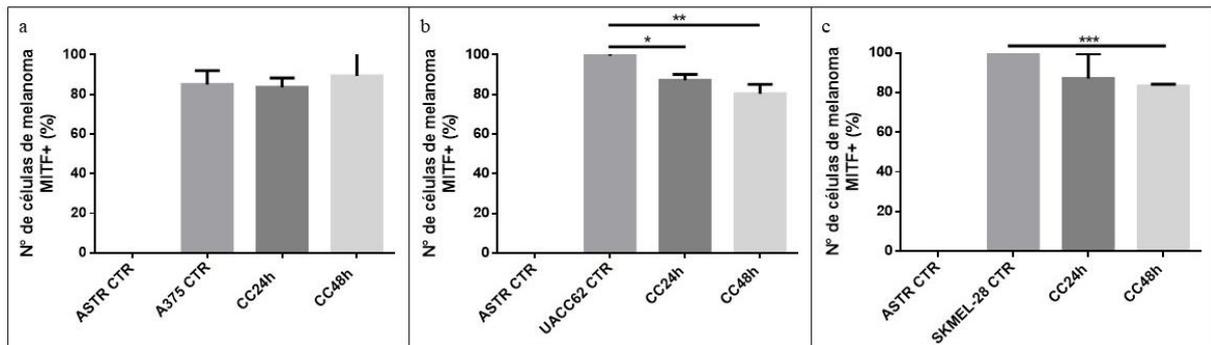


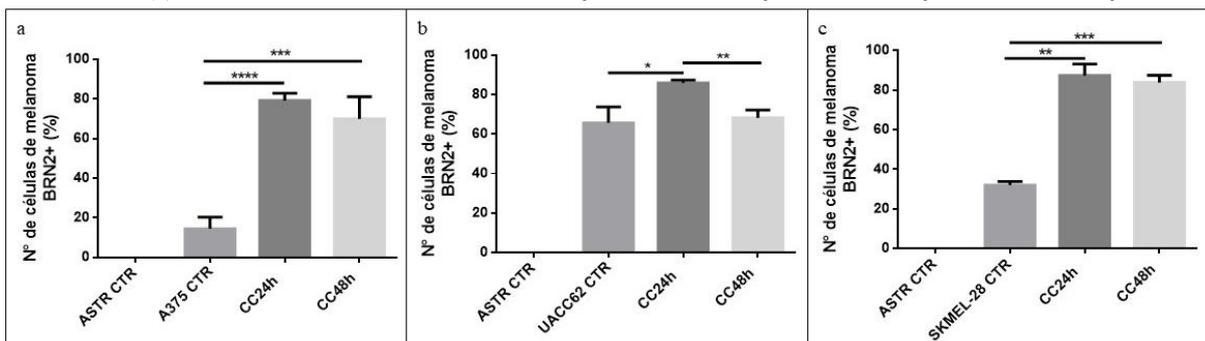
Figura 27 – Número de células de melanoma MITF+ em porcentagem. (a) MITF+ em A375. (b) MITF+ em UACC62. (c) MITF+ em SKMEL-28. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.



Mais uma vez, o aumento da expressão de BRN2 devido às interações celulares diretas foi mais significativo que a redução do MITF, especialmente nas linhagens A375 e SKMEL-28, mas com leves reduções da expressão entre 24 e 48 horas nas três linhagens (Figura 28).

A quantidade de células positivas para A375 foi de níveis basais CTR=14,43±5,86 para CC24h=79,19±3,70 ($p < 0.0001$) e para CC48h=69,93±11,21 ($p < 0.001$), enquanto a SKMEL-28 foi de CTR=32,04±1,81 para CC24h=87,37±5,81 ($p < 0.01$) e para CC48h=83,85±3,67 ($p < 0.001$) (dados em %). Já a UACC62, apresentou também um aumento entre os níveis basais CTR=65,72±8,10 e CC24h=85,94±1,45 ($p < 0.05$), mas com uma redução significativa entre 24h e 48 horas, indo para CC48h=68,25±3,92 ($p < 0.01$), sem ser estatisticamente diferente dos níveis basais (dados em %).

Figura 28 – Número de células de melanoma BRN2+ em porcentagem. (a) BRN2+ em A375. (b) BRN2+ em UACC62. (c) BRN2+ em SKMEL-28. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.



4.1.5 Efeito do meio condicionado dos melanomas sobre as culturas primárias

4.1.5.1 Expressão protéica de MITF e BRN2

Apesar de nem os astrócitos isolados nem a cultura primária mista expressarem a proteína MITF, ao serem expostos ao MC de diferentes tempos produzido pelas linhagens de melanoma, os astrócitos passaram a expressar tal fator de transcrição relacionado à proliferação melanocítica (Figura 29). Inclusive, essa expressão protéica de MITF pelos astrócitos isolados

foi mais intensa após 48 horas de exposição ao MC produzido por 48 horas (48MC48), nas linhagens SKMEL-28 e UACC62.

Ademais, a expressão protéica do MITF também não sofreu alteração quando os fatores solúveis foram incubados sobre as células mistas, nem quando foi o MC oriundo de PANC-1, tampouco promoveu a mesma indução para a expressão protéica do BRN2, relacionado à invasividade.

4.1.5.2 Proliferação das culturas primárias

O MC das linhagens tumorais não alterou a expressão protéica do marcador de proliferação KI67 nos astrócitos, nem nas células mistas (dados não demonstrados).

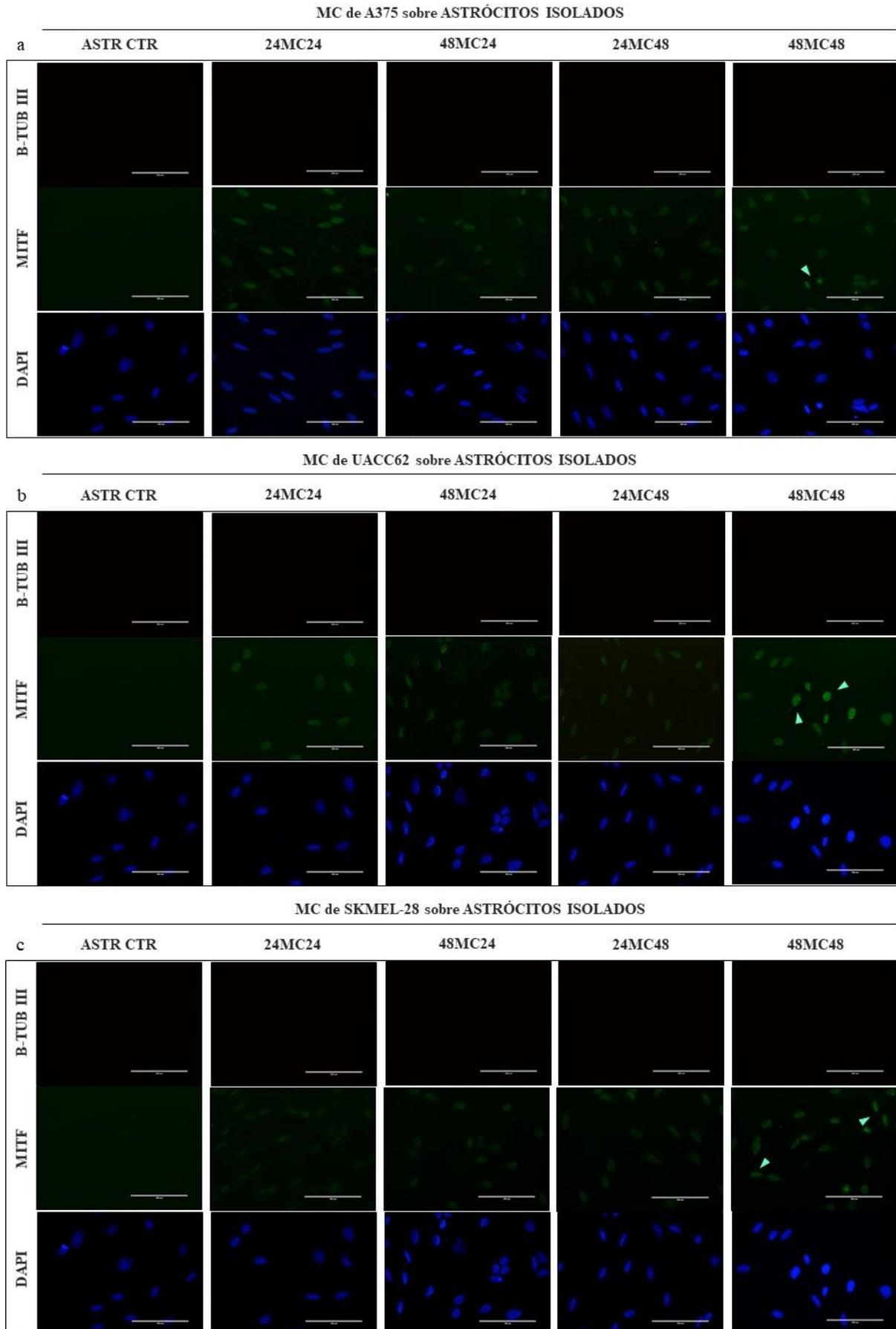
4.1.6 Efeito do meio condicionado das culturas primárias sobre as linhagens tumorais

4.1.6.1 Expressão de MITF e BRN2

A fim de entender a influência dos fatores solúveis liberados pelos componentes do nicho pré-metastático sobre a expressão protéica dos marcadores MITF e BRN2, analisou-se a influência do MC oriundo das células mistas e dos astrócitos isolados sobre subpopulações de melanoma, em relação a esses fatores de transcrição (Figura 30). De forma geral, entre a expressão protéica basal de MITF e os fatores solúveis expostos durante 24 horas, observou-se uma redução significativa nas três linhagens, quando a origem dos fatores era as células mistas. O MC astrocitário teve maior efeito na redução do fator de transcrição MITF pelo melanoma quando as células foram expostas por 48 horas.

Especificamente, em relação à expressão protéica de MITF devido aos fatores de células mistas, houve uma redução percentual significativa nas três linhagens, quando expostas por 24 horas a fatores precoces, como a A375 CTR=83,33±9,43; 24MC24=44,18±12,9 ($p<0.001$) e a UACC62 CTR=100; 24MC24=87,21±6,38 ($p<0.05$) (dados em %). Na SKMEL-28, o MC de células mistas reduziu a quantidade de células MITF+ quando expostas a todas as condições, mas sendo mais significativo quando exposta por 48 horas, onde elas foram de 100% expressando o fator de transcrição MITF para 24MC24=77,59±9,28 ($p<0.05$), 48MC24=88,27±3,59 ($p<0.01$), 24MC48=94,16±2,92 ($p<0.05$) e 48MC48=73,96±3,94 ($p<0.001$) (dados em %).

Figura 29 – Expressão do fator de transcrição MITF pelos astrócitos quando expostos ao meio condicionado das linhagens de melanoma. Astrócitos com maior intensidade na expressão do MITF nas setas azuis; (a) MC oriundo da A375. (b) ME oriundo da UACC62. (c) MC oriundo da SKMEL-28. Objetiva 40x.

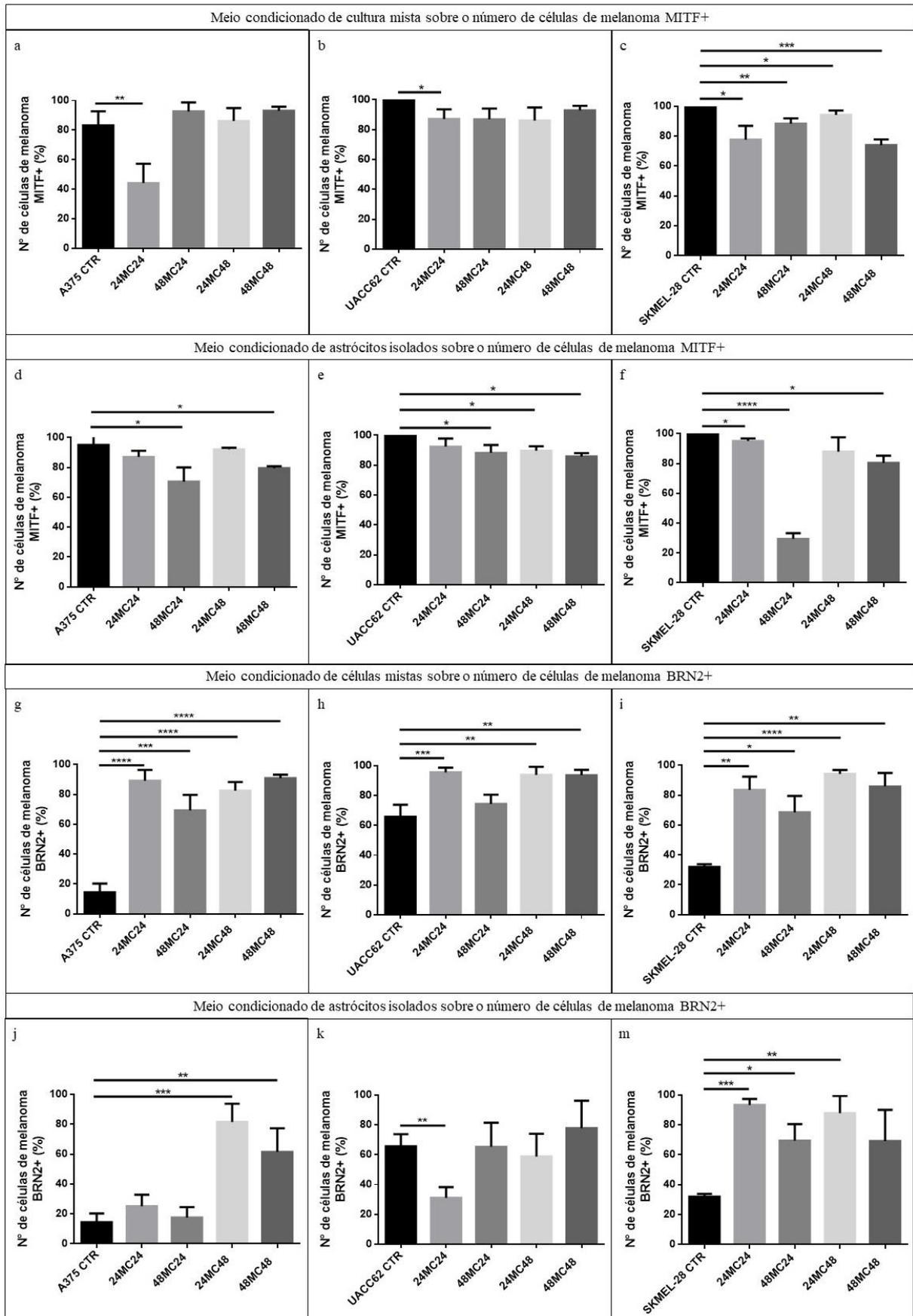


O mesmo efeito sobre a expressão protéica de MITF foi analisado em relação aos fatores liberados pelos astrócitos isolados, onde a exposição aos fatores precoces por 24 horas só reduziu a expressão pela SKMEL-28, a qual foi de 100% para $95,09 \pm 1,65$ ($p < 0,05$). Já a exposição desses fatores por 48 horas, reduziu a expressão protéica de MITF nas três linhagens, mas de forma bastante significativa na SKMEL-28 CTR=100% para $48MC24=29,47 \pm 3,83$ ($p < 0,0001$). O MC de astrócitos também reduziu a quantidade de células MITF+ nas três linhagens quando expostas durante 48 horas aos fatores tardios.

Em relação à expressão de protéica BRN2 pelas células de melanoma, o MC de células mistas induziu aumento da expressão desse fator de transcrição em quase todos os tempos de exposição e condições experimentais, exceto na UACC62, quando exposta por 48 horas aos fatores de 24h (Figura 30). A exposição das células, durante 24 horas, aos fatores produzidos por 24 horas foi uma das mais influentes na expressão protéica do BRN2, a saber: A375 CTR= $14,43 \pm 5,86$; $24MC24=89,2 \pm 7,18$ ($p < 0,0001$); UACC62 CTR= $65,72 \pm 8,1$; $24MC24=95,57 \pm 3,03$ ($p < 0,0001$); e SKMEL-28 CTR= $32,04 \pm 1,81$; $24MC24=83,64 \pm 8,84$ ($p < 0,001$).

Já o MC de astrócitos influenciou a expressão protéica de BRN2 de forma bastante heterogênea, mas tendo um efeito maior sobre a linhagem SKMEL-28, a qual apresentava um número de células com expressão protéica basal de CTR= $32,04 \pm 1,81$, aumentando para $24MC24=93,37 \pm 4,0$ ($p < 0,0001$); $48MC24=69,44 \pm 11,06$ ($p < 0,05$) e; $24MC48=87,84 \pm 11,52$ ($p < 0,001$) (dados em %). O aumento de células positivas para BRN2 também ocorreu na A375, mas apenas quando exposta durante 48 horas, onde a expressão foi de CTR= $14,43 \pm 5,86$ para $48MC24=81,52 \pm 12,26$ ($p < 0,001$) e $48MC48=61,5 \pm 15,75$ ($p < 0,01$) (dados em %). A UACC62, por sua vez, apresentou uma redução significativa na expressão protéica de BRN2 entre o CTR= $65,72 \pm 8,1$ e $24MC24=31,09 \pm 7,23$, retornando a níveis próximos do controle nas demais condições, sem diferença significativa (dados em %).

Figura 30 – Número de células de melanoma MITF+ e BRN2+ em porcentagem, após exposição ao meio condicionado de células mistas (a-c) e (g-h) e de astrócitos isolados (d-f) e (j-m). (a) e (d) MITF+ em A375. (b) e (e) MITF+ em UACC62. (c) e (f) MITF+ em SKMEL-28. (g) e (j) BRN2+ em A375. (h) e (k) BRN2+ em UACC62. (i) e (m) BRN2+ em SKMEL-28. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.



4.1.6.2 Proliferação das linhagens tumorais

O MC originado pelas células mistas favoreceu a proliferação das linhagens de melanoma quando expostas por 24 horas, enquanto teve efeito oposto na proliferação de células pancreáticas (Figura 31). O n° células/mLx10⁴ da A375 controle era de 6,8±1,48, com a exposição ao MC das células mistas, esse número de células chegou a 24MC24=15,16± 1,75 (p<0.001) e 24MC48=18±2,45 (p<0.0001). A SKMEL-28 sem exposição a fatores externos proliferou em 24 horas para um número de CTR=5,6±1,66, mas ao ser exposta aos fatores de células mistas, sua proliferação foi para 24MC24=12,1±1,14 (p<0.0001) e 24MC48=14,7±1,89 (p<0.0001) e a UACC62 foi de CTR=4,95±1,10 para 24MC24=17,66±2,56 (p<0.0001) e 24MC48=12,4±1,80 (p<0.0001).

A partir de 48 horas de exposição os mesmos fatores não produziu aumento significativo na proliferação celular tumoral, quando comparados ao controle. PANC-1 teve diminuição da proliferação celular quando exposta a esses mesmos fatores durante 24 horas, onde inicialmente era CTR=12,65±2,17, quando exposta ao MC de células mistas sua proliferação reduziu para 24MC24=6,33±1,89 (p< 0.01) e 24MC48=3,6±1,19 (p<0.0001).

Já o efeito do MC produzido pelos astrócitos isolados mostrou que a A375 novamente foi mais afetada quando exposta durante 24 horas e a UACC62 e a SKMEL-28 foram influenciadas quando expostas tanto durante 24, como durante 48 horas (Figura 32). Entretanto, a proliferação de A375 foi mais significativa, onde vimos seu número de células ir de CTR=6,8±1,48 para 24CM24=16,66±3,21 (p<0.001) e 24MC48=17,33±6,11 (p<0.01).

Em 24 horas, a UACC62 apresentou uma proliferação de CTR=4,95±1,10 para 24MC24=7,16±1,04 (p<0.05) e 24MC48=7,83±1,25 (p<0.05) e, em 48 horas, foi de CTR=3,7±1,00 para 48MC24=7,66±1,89 (p<0.01) e 48MC48=9,08±3,5 (p<0.01). A SKMEL-28 também apresentou uma proliferação maior, mas com menos significância estatística, onde foi de CTR=5,26±1,66 para 24MC24=6,5±1,32 (p<0.05) e 24MC48=8,91±1,80 (p<0,05) nas primeiras 24 horas de exposição e, de CTR=7,93±0,59 para 48MC24=12,41±3,30 (p<0.05) e 48MC48=11,08±2,5 (p<0.05), após 48 horas de exposição.

PANC-1 mais uma vez não foi influenciada pelos fatores solúveis em 48 horas de exposição, mas em 24 horas teve sua proliferação reduzida de CTR=12,65±1,67 para 24MC24=6,3±2,51 (p<0.01) e 24MC48=5,83±1,04 (p<0.01).

Figura 31 – Efeito da exposição ao meio condicionado de células mistas na proliferação celular tumoral. (a) Proliferação da A375. (b) Proliferação da UACC62. (c) Proliferação da SKMEL-28. (d) Proliferação da PANC-1. **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001.

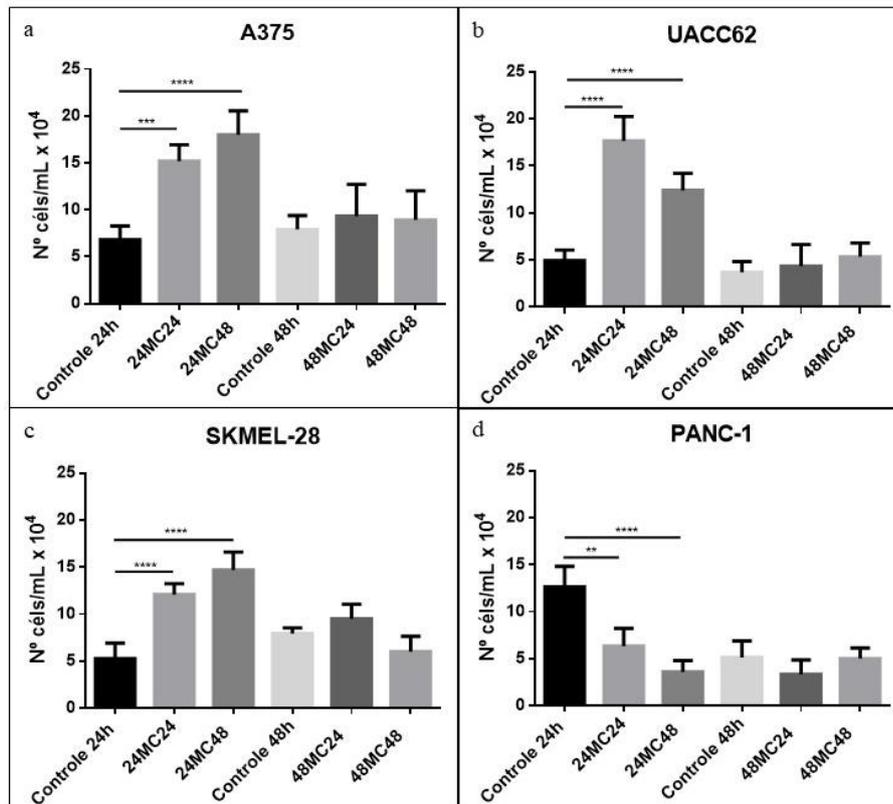
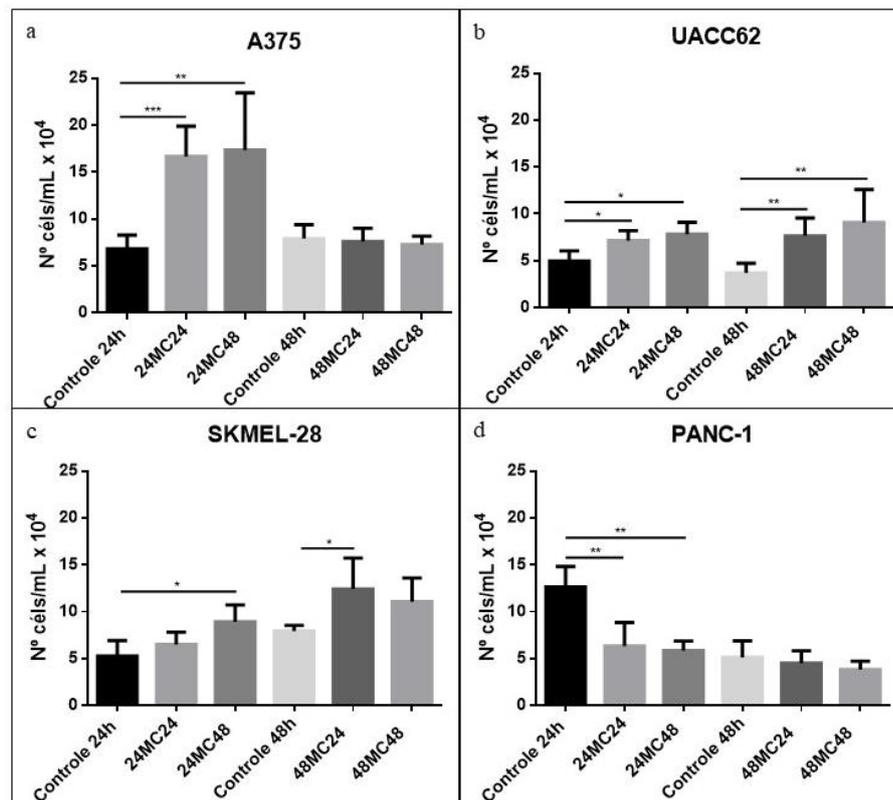


Figura 32 – Efeito da exposição ao meio condicionado de astrócitos na proliferação celular tumoral. (a) Proliferação da A375. (b) Proliferação da UACC62. (c) Proliferação da SKMEL-28. (d) Proliferação da PANC-1. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

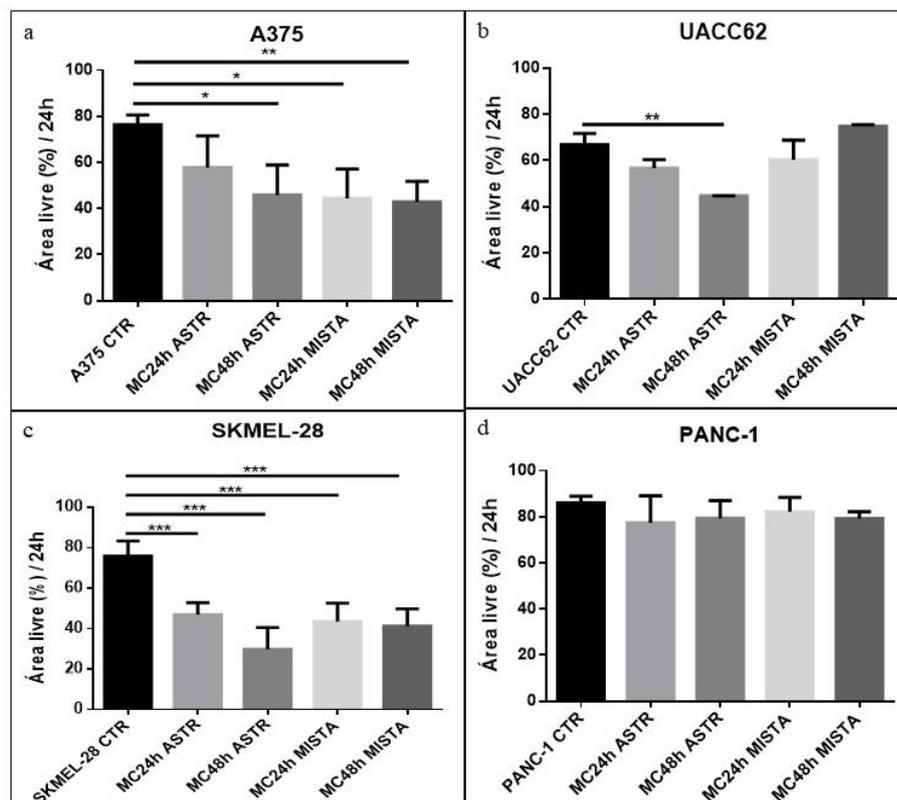


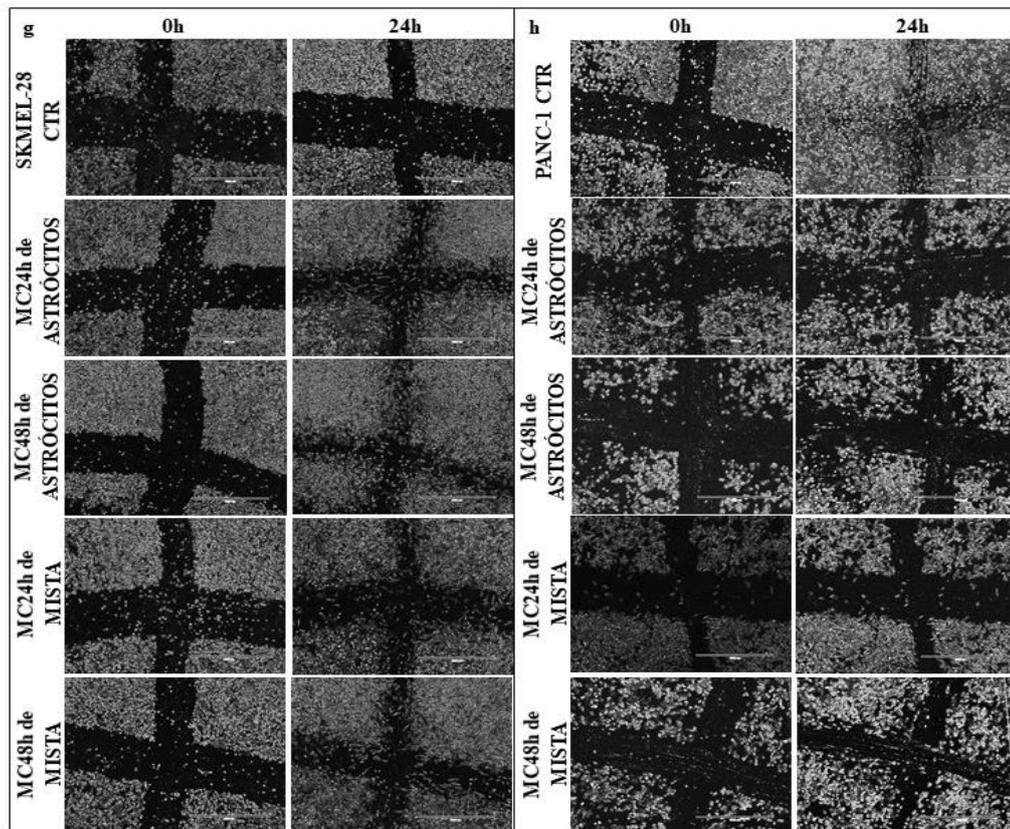
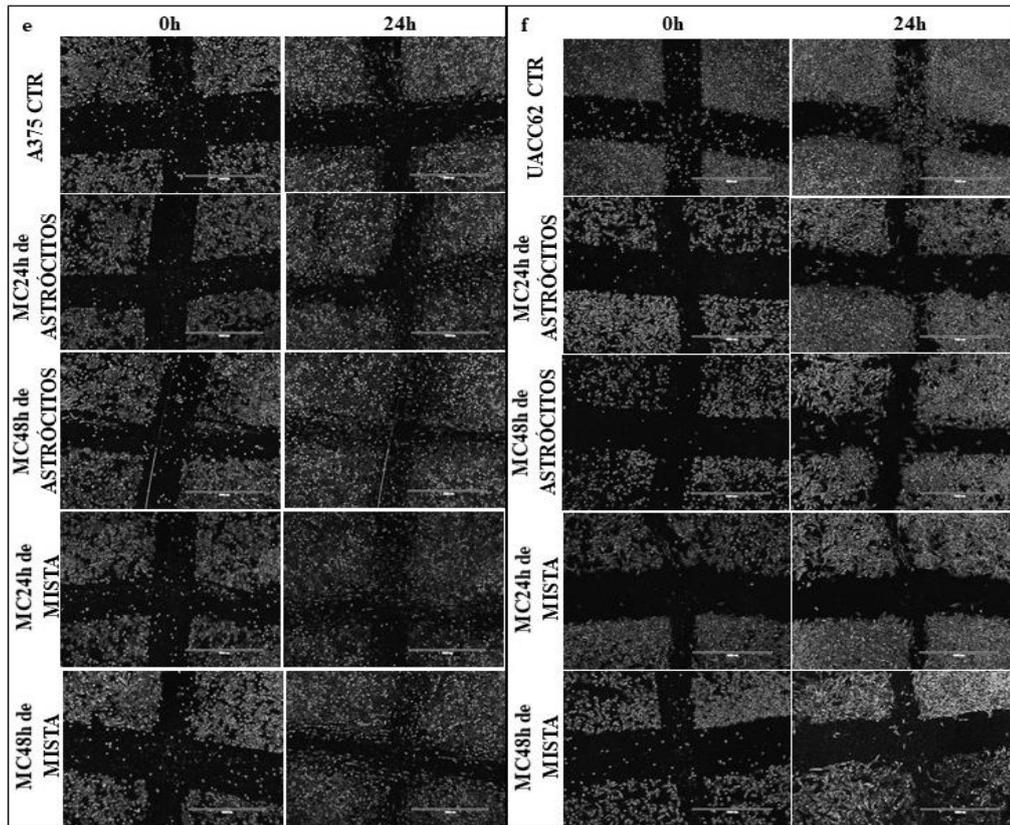
4.1.6.3 Migração das linhagens tumorais

O ensaio de migração celular tumoral pela técnica *wound-healing* analisou o efeito do MC proveniente das células mistas e dos astrócitos sobre as linhagens tumorais (Figura 33). A A375 e a SKMEL-28 foram as mais favoravelmente influenciadas, com aumento estatístico significativo nas quatro condições comparadas ao controle. A linhagem A375 migrou mais quando exposta aos fatores solúveis de células mistas e aos fatores tardios do MC de astrócitos (% Área livre média CTR=76,26±4,27; MC24h ASTR=57,67±13,87; MC48h ASTR=45,87±12,97; MC24h MISTA=44,35±12,73; MC48h MISTA=42,9±8,85). Enquanto a SKMEL-28 foi a mais afetada pelos fatores solúveis liberados tanto pelos astrócitos, como pelas células mistas (% Área livre média CTR=75,98±7,38; MC24h ASTR=46,97±5,87; MC48h ASTR=26,84±10,75; MC24h MISTA=43,52±9,21; MC48h MISTA=41,26±8,54).

Já a UACC62 foi afetada significativamente apenas pelo MC produzido durante 48 horas pelos astrócitos isolados (% Área livre média CTR=66,88±4,83; MC48h ASTR=44,67±0,03). A PANC-1 mais uma vez não influenciada pelos fatores solúveis cerebrais.

Figura 33 – Efeito da exposição ao meio condicionado de células mistas e de astrócitos na migração celular tumoral. (a) e (e) Migração da A375. (b) e (f) Migração da UACC62. (c) e (g) Migração da SKMEL-28. (d) e (h) Migração da PANC-1. *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001.





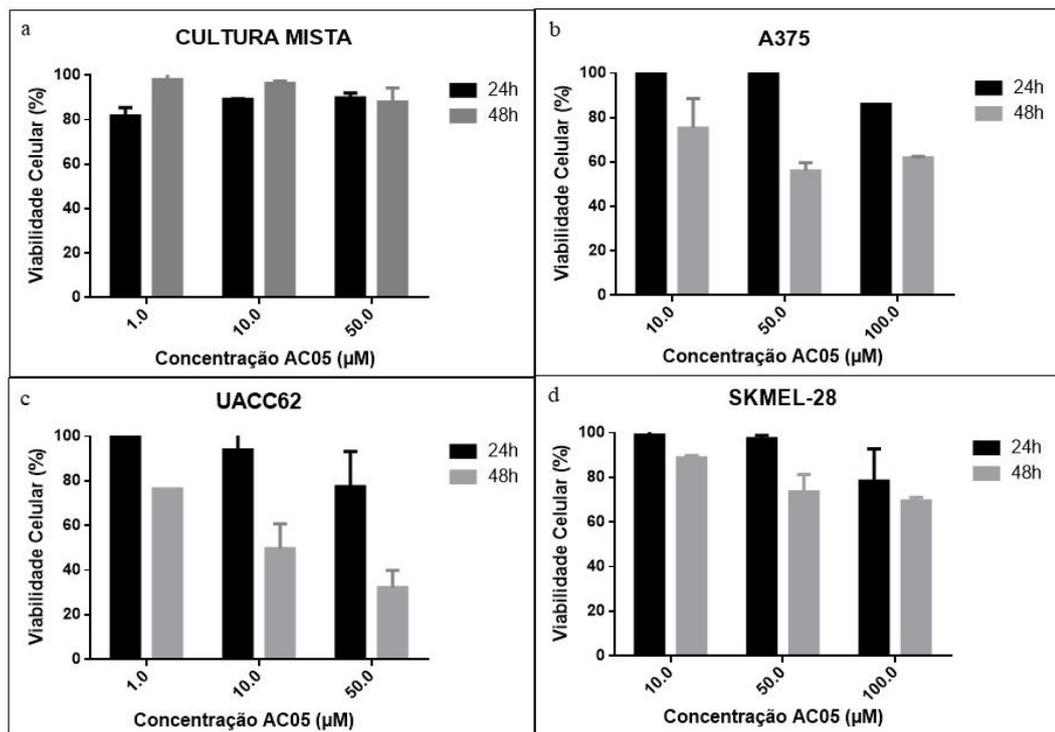
4.2 INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA CONTRA O MELANOMA E CONTRA O MODELO DE METÁSTASE CEREBRAL DE MELANOMA

4.2.1 Avaliação da potencial atividade antineoplásica do derivado imidazacridínico AC05 frente às linhagens tumorais

4.2.1.1 Avaliação da citotoxicidade do AC05 *in vitro*

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, já havia sido demonstrado que o AC05 não é tóxico para células saudáveis ($IC_{50} \geq 100\mu M$) (CHAGAS, 2016). No presente trabalho, demonstrou-se que o composto também não é tóxico para as células componentes do ambiente cerebral, dado que não foi capaz de reduzir a viabilidade celular das mesmas a menos de 50% (Figura 34). Contra as linhagens de melanoma estudadas, o derivado imidazacridínico foi eficaz em reduzir a viabilidade celular a menos de 50% apenas da UACC62, em três experimentos independentes ($IC_{50} = 28,29\mu M \pm 0,6$), com $IS=3,53$.

Figura 34 – Efeito do tratamento de AC05 sobre a viabilidade celular durante 24 e 48 horas. (a) Cultura mista. (b) A375. (c) UACC6. (d) SKMEL-28.

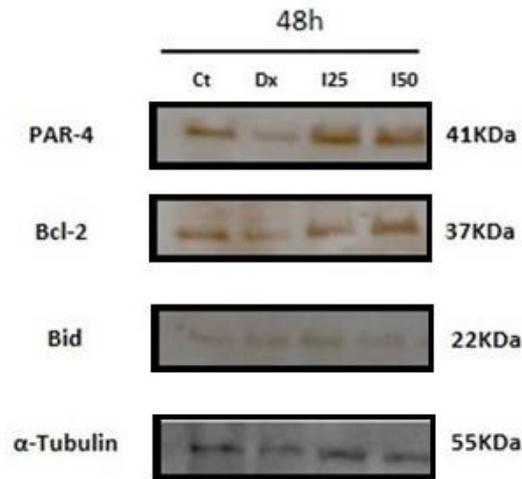


4.2.1.1.1 Efeito do AC05 na expressão protéica de supressores tumorais

O tratamento da linhagem UACC62 durante 48 horas com o derivado imidazacridínico AC05 na concentração de seu IC_{50} mostrou aumento da expressão protéica de supressores tumorais (PAR-4 e BID), maior que o encontrado após o tratamento com um fármaco padrão, a Doxorubicina (Figura 35). Também é possível observar um aumento da proteína anti-

apoptótica Bcl-2. O resultado é referente a 2 experimentos independentes, precisando ainda ser finalizado.

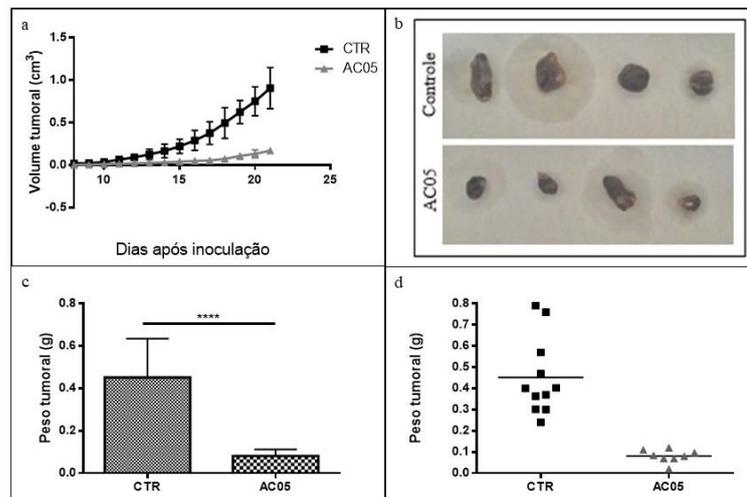
Figura 35. Expressão protéica após tratamento com AC05 na UACC62 por 48 horas. Ct: Controle; Dx: Doxorubicina; I25: IC₂₅; I50: IC₅₀; PAR-4: *Prostate Apoptosis Response-4*; Bcl-2: *B-cell Lymphoma-2*; Bid: *BH3 Interacting-domain death agonist*; α -Tubulin: controle endógeno.



4.2.1.2 Avaliação da atividade antitumoral do AC05 *in vivo*

Para confirmarmos a atividade antineoplásica do derivado, testou-se seu efeito num modelo *in vivo* de xenoenxerto. No modelo animal, o composto AC05 reduziu o tamanho tumoral da linhagem de melanoma UACC62 de forma significativa no grupo tratado ($v = 0,015 \pm 0,0041\text{cm}^3$) em relação ao grupo controle ($v=0,16 \pm 0,043\text{cm}^3$), em cerca de 55% na concentração de 30mg/kg, correspondente ao IC₅₀ de 28 μM (Figura 36). A redução do peso tumoral entre o grupo controle e o tratado foi de 82%.

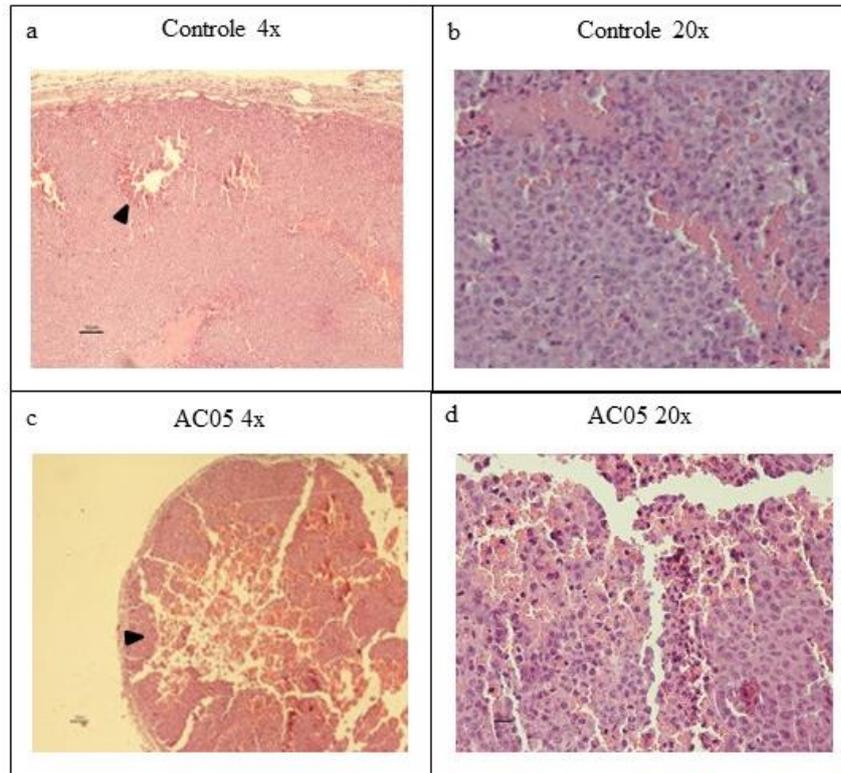
Figura 36 – Resultados da atividade antitumoral do AC05 *in vivo*. (a) Redução do volume tumoral no grupo tratado com AC05 comparado ao grupo veículo (CTR); (b) Imagens representativas dos tumores retirados dos animais n=3; (c) e (d) Redução do peso tumoral no grupo tratado com AC05 comparado ao grupo controle. (***p<0.0001).



4.2.1.2.1 Efeito do AC05 frente à linhagem UACC62

A HE foi feita nos tumores retirados dos animais dos grupos controle e AC05. A figura 37 mostra que os tumores tratados com AC05 apresentam menos células (fotos a 20x) e áreas de morte celular mais extensas que no grupo controle (fotos a 4x).

Figura 37 - Imunohistoquímica Hematoxilina-Eosina nos tumores retirados dos animais.

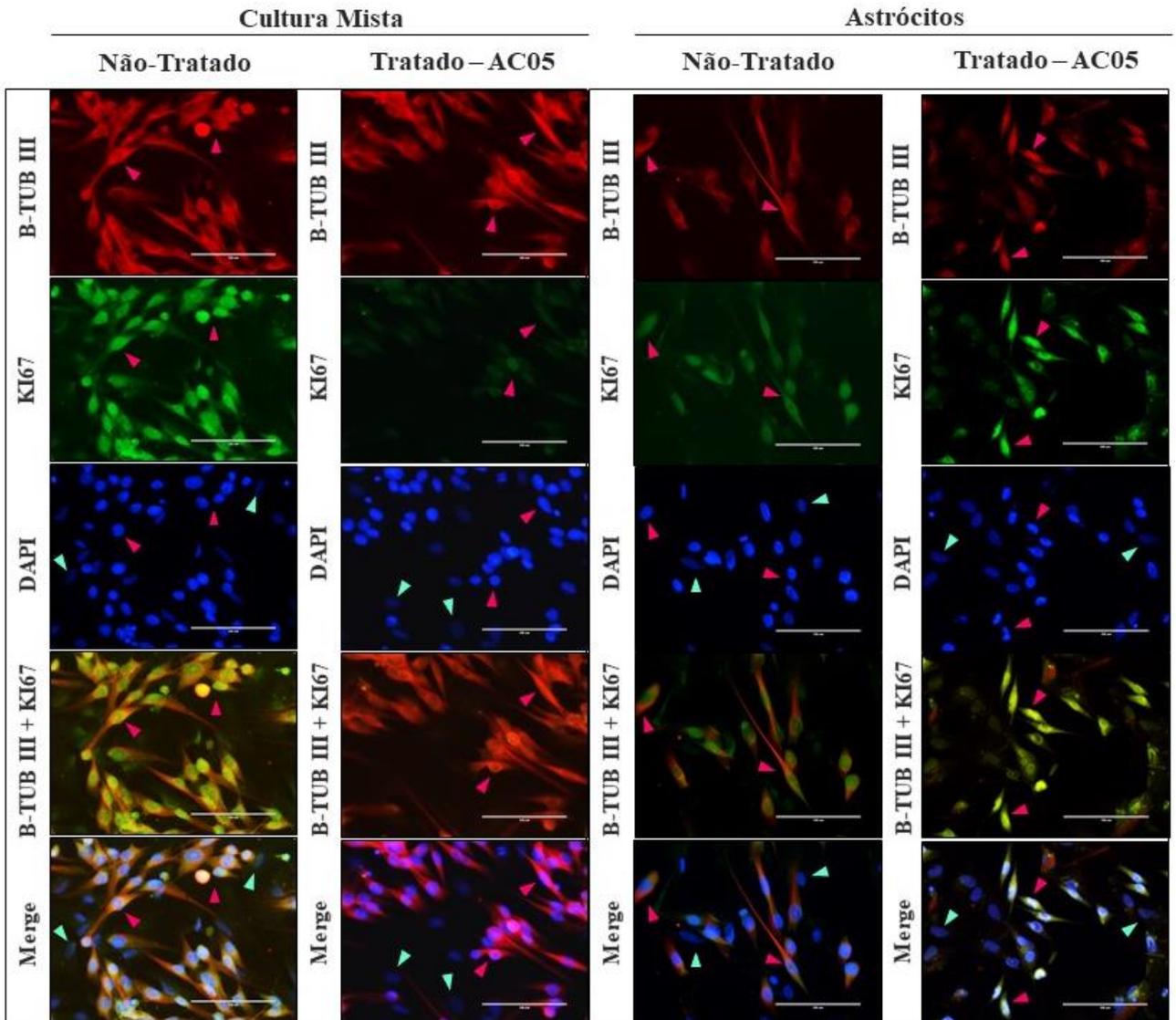


4.2.2 Avaliação da atividade antitumoral do AC05 no modelo de metástase cerebral *in vitro*

Por fim, decidiu-se analisar o efeito do AC05 frente à metástase cerebral de melanoma, da linhagem UACC62, no modelo *in vitro* caracterizado anteriormente. Através da imunofluorescência, foram analisadas a expressão do marcador de proliferação KI67 nas condições tratadas e não tratadas, em co-culturas sobre as células mistas e sobre os astrócitos isolados (Figura 38).

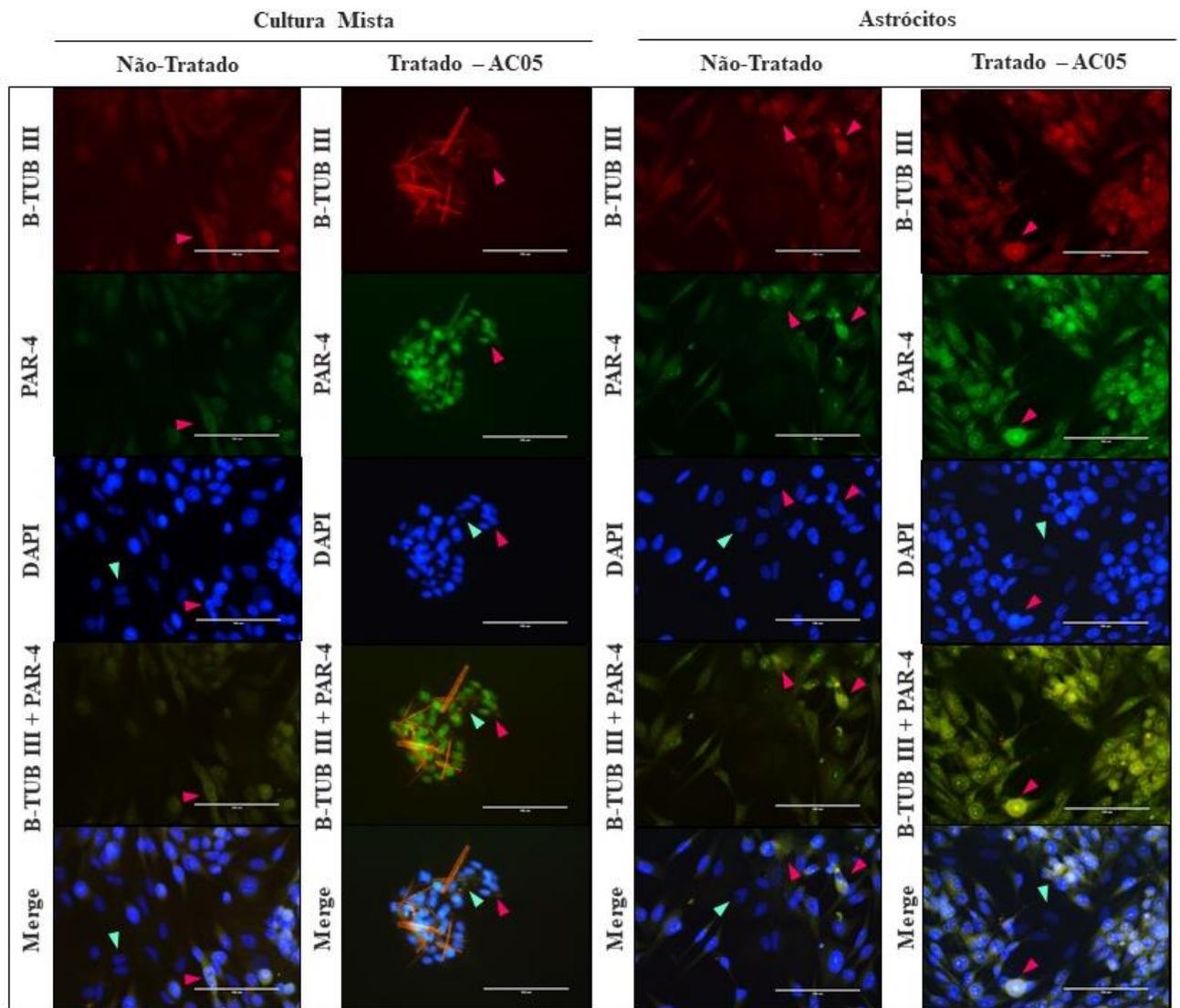
É possível perceber que a proliferação tumoral da UACC62 não foi afetada pelo tratamento quando na co-cultura sobre os astrócitos isolados, enquanto que quando em presença das células mistas, o AC05 foi capaz de reduzir a marcação de proliferação da UACC62.

Figura 38 – Expressão de KI67 pelas células UACC62 em co-culturas cerebrais tratadas e não tratadas com o AC05 (28 μ M). Astrócitos nas setas azuis e UACC62 nas células cor de rosa. Objetiva 40x.



Para mais, decidiu-se investigar a expressão do supressor tumoral PAR-4, proteína pró-apoptótica muitas vezes reduzidas nos tumores. Observou-se que, a localização de PAR-4 pelas células de melanoma foi citoplasmática nas condições controle, sofrendo uma realocação para o núcleo na condição da co-cultura sobre as células mistas, indicando um possível processo apoptótico induzido pelo AC05 (Figura 39).

Figura 39 – Expressão de PAR-4 pelas células UACC62 em co-culturas cerebrais tratadas e não tratadas com o AC05 (28 μ M). Astrócitos nas setas azuis e UACC62 nas células cor de rosa. Objetiva 40x.



5 DISCUSSÃO

Para o estabelecimento do modelo verificou-se que a redução do SFB a 0,5% não interferiu na viabilidade celular das linhagens (Figura 16). Esse resultado faz-se de extrema importância, dado que os componentes do SFB são essenciais para o desenvolvimento e proliferação celulares, como fatores de crescimento, hormônios, vitaminas e aminoácidos (ASWAD; JALABERT; ROME, 2016).

Exatamente pela influência direta que esse reagente pode exercer, reduzir sua presença para as mínimas condições aceitáveis é crucial para o entendimento correto dos resultados obtidos sob esses parâmetros experimentais, como exposto anteriormente (DE OLIVEIRA BARROS et al., 2014). Pode-se assim afirmar que toda mudança nas células primárias, dentro da avaliação das interações direta ou indireta com as linhagens tumorais, será fruto dessa interação e não dos componentes do SFB. A partir do estabelecimento desses parâmetros iniciais, deu-se então a caracterização das células em estudo.

Na caracterização das linhagens tumorais, foi possível observar que as linhagens de melanoma de forma basal também expressam marcadores que seriam específicos de neurônios e astrócitos, a β -Tub III e o GFAP, respectivamente (Figura 17). A β -Tub III faz parte de uma família de proteínas de microtúbulo, normalmente expressas por células de origem neuronal, mas que também têm sido observadas em tecidos normais como intestino, cólon e placenta (PERSON et al., 2017).

A β -Tub III também foi reportada como presente em algumas neoplasias como pulmonares, ovarianas, mamárias e no melanoma, nos quais sua maior expressão tem sido relacionada a uma menor resposta a determinados tratamentos cujo alvo principal são os microtúbulos do citoesqueleto (AKASAKA et al., 2009; SHIMIZU et al., 2016). Person et al., através da técnica *Tissue Microarray*, demonstraram uma forte expressão da β -Tub III em tumores primários de cérebro (85-10%), de pulmão (35-80%) e em melanomas (77%) (PERSON et al., 2017).

Já o GFAP (do inglês: *glial fibrillary acidic protein*) é uma proteína de filamento intermediário, sendo o principal constituinte do citoesqueleto dos astrócitos e conhecidamente utilizado como marcador de diferenciação dessas células, há mais de 30 anos (ENG, 1985; OBERHEIM; GOLDMAN; NEDERGAARD, 2012; TAFT; VERTES; PERRY, 2005). Sua expressão por linhagens de melanoma de forma basal também já havia sido reportada num estudo sobre os padrões de diferenciação neural nos melanomas (IYENGAR; SINGH, 2010). Este trabalho mostrou que quase 70% dos tumores na fase de VGP expressam um ou mais

marcadores neurais, como GFAP, sinaptofisina ou a proteína do neurofilamento e, destes, 69,2% marcaram GFAP.

Como visto no item 2.1.3, a fase de progressão do melanoma denominada VGP é principalmente caracterizada pelos comportamentos migratório, angiogênico e invasivo, devido à habilidade proliferativa para diferentes direções e que estão presentes nas três linhagens de melanoma escolhidas no presente trabalho (IYENGAR; SINGH, 2010). Uma das hipóteses para a expressão de marcadores específicos de neurônios e astrócitos por células de melanócitos foi reportada por Sommer, em 2011, seria devido à origem em progenitores da crista neural, mas tal comportamento em células de melanoma ainda não foi confirmado como tendo a mesma explicação (SOMMER, 2011). Apesar de ainda não ser confirmada a causa da expressão de marcadores tão diferenciados no melanoma, certamente caracteriza a afinidade entre esses diferentes tecidos.

A expressão protéica do MITF pelas células de melanoma isoladas em paralelo com a menor expressão protéica do BRN2 (Figuras 18 e 19) corrobora o fato de que essas células estão em proliferação ativa (Figura 20: KI67+), mas sem estímulos que as induzam a um estado de invasão. Simmons et al., reportaram inclusive que a expressão de BRN2 para manutenção o crescimento tumoral primário é dispensável, sendo necessário apenas o MITF (SIMMONS et al., 2017). A maior expressão de BRN2 pela linhagem SKMEL-28 pode caracterizar um perfil mais invasivo das subpopulações dessa linhagem. De forma basal, temos então que as linhagens de melanoma isoladas escolhidas para o estudo estavam num fenótipo MITF^{HIGH}/BRN2^{LOW} e que qualquer mudança nesse status seria relacionada às interações com as células e fatores secretados do microambiente metastático em estudo.

A expressão protéica de KI67 pelas quatro linhagens tumorais mostrou que o processo de proliferação se encontrava mantido e ativo, estando as células com o comportamento proliferativo padrão do contexto tumoral (Figura 20). Interessantemente, a linhagem SKMEL-28 foi a única que apresentou uma marcação do KI67 com localização citoplasmática, enquanto as outras apresentaram a localização nuclear comum. O KI67 é uma proteína extensamente utilizada como marcador de proliferação celular há décadas. Sua expressão por células em intérfase, bem como em mitose, promove uma variação na distribuição celular durante a progressão do ciclo celular, entretanto sempre com localização nuclear (SUN; KAUFMAN, 2018).

Entretanto, já foi demonstrado que a proteína inteira do KI67 não fica associada à cromatina, pois após a quebra da membrana nuclear durante a divisão celular, parte do KI67 se

distribuí de forma difusa pelo citoplasma (SCHOLZEN T; J, 2000). Mais recentemente, um estudo reportou que o KI67 é necessário para manutenção dos cromossomos mitóticos individuais dispersos no citoplasma após sua liberação do envelope nuclear, através de um mecanismo surfactante (CUYLEN et al., 2016).

A singularidade de apenas uma linhagem de melanoma ter apresentado a marcação do KI67 de forma citoplasmática requer confirmação através de outros ensaios acerca da capacidade proliferativa da linhagem, inclusive por outros marcadores desse processo celular, bem como através de outros clones imunogênicos de anticorpos α -KI67 pela mesma técnica de imunofluorescência.

As culturas cerebrais primárias corticais mistas são um tipo de cultura que muito se aproxima de um microambiente cerebral *in vivo*, dado que ela apresenta todos os tipos de células diretamente oriundas e presentes no tecido cerebral cortical (DE VELLIS; COLE, 2012). A caracterização das culturas primárias mostrou que as mesmas se encontravam em um estado proliferativo normal (KI67+), tanto nas culturas mistas (Figura 21), com a presença de neurônios (β -Tub III+) e astrócitos (GFAP+), bem como nas culturas dos astrócitos isolados (Figura 22 – β -Tub III-). A marcação de GFAP num amplo citoplasma demonstra a maturidade dos astrócitos em ambas as condições de cultura primária, bem como a não presença de astrócitos reativos, evidenciando de fato uma cultura saudável e sob parâmetros experimentais adequados.

Nas co-culturas em células mistas foi possível observar no merge que o marcador β -Tub III prevaleceu frente à marcação do GFAP pelas linhagens de melanoma, ao contrário do que aconteceu com a linhagem PANC-1, a qual teve essa expressão reduzida, tanto em 24 como 48 horas (Figura 23). Já nas co-culturas sobre os astrócitos isolados, observou-se uma co-cultura bem estabelecida onde as linhagens tumorais também apresentaram suas colônias como esperado, dada a importância dos astrócitos na metástase cerebral (Figura 26) (ALEČKOVIĆ; KANG, 2015; KLEIN et al., 2015).

Com as co-culturas estabelecidas e caracterizadas, deu-se a análise do possível efeito da interação direta entre as linhagens de melanoma e as células do nicho metastático, seja na condição mista, seja dos astrócitos isolados, sobre a expressão protéica de MITF. No caso das culturas mistas, apesar de não haver diferença significativa entre a marcação basal apresentada pelos melanomas e as co-culturas de 24 e 48 horas, tivemos tendências de comportamento dentro da heterogeneidade celular de cada linhagem. Enquanto a A375 expressou uma leve tendência de aumento de células positivas para MITF, a UACC62 e a SKMEL-28 apresentaram

uma tendência à redução do fator de transcrição, mas nenhum resultado com significância estatística (Figura 24).

Esse último resultado segue de acordo com diversos trabalhos que relatam que o estabelecimento da metástase é caracterizado por uma redução da expressão desse marcador, onde um estado de invasão maior que de proliferação ou diferenciação ocorre no fenótipo MITF^{LOW} (FANE et al., 2017b; SMITH et al., 2018; WELLBROCK; AROZARENA, 2015b). Entretanto, destaca-se que a redução protéica de MITF não deve ser relacionada com redução direta da proliferação celular, podendo ser redução de outros fenótipos como diferenciação ou senescência (VLČKOVÁ et al., 2018).

Assim, um dos principais achados em um modelo de metástase é o aumento da quantidade de células BRN2+, que na verdade precede e regula a diminuição de MITF (FANE et al., 2019). Na figura 25, vemos que, tanto em comparação à expressão basal, como em relação às interações estabelecidas entre 24 e 48 horas de co-cultura, a intervenção sobre células mistas promoveu um aumento de células positivas para BRN2. A linhagem A375 foi a que mais teve aumento desse fator de transcrição, mas as três apresentaram aumento significativo entre 24 e 48 horas, mostrando que ao microambiente promoveu uma modulação na expressão do BRN2. Esse aumento relativamente tardio do BRN2 na co-cultura explica a redução não significativa do MITF no mesmo período, o que poderia ocorrer caso a co-cultura fosse mantida por um período maior que 48 horas.

Por outro lado, os astrócitos foram capazes de reduzir significativamente a quantidade de células MITF+ na UACC62 e SKMEL-28 quando a interação entre eles e as linhagens de melanoma foi isolada, indicando uma via funcional na qual de fato eles facilitam a invasão metastática (Figura 27). Contudo, ao analisar o ganho de capacidade invasiva dos melanomas com a expressão protéica do BRN2, vemos que os astrócitos induziram o aumento da expressão desse marcador pelos melanomas quando comparado à condição basal das linhagens isoladas, mas apresentaram uma tendência de redução de 24 para 48 horas de interação nas três linhagens, sendo significativo na linhagem UACC62 (Figura 28).

Ao analisar o efeito das interações indiretas, ou seja, o efeito do MC, entre as linhagens de melanoma e as células da cultura primária, percebeu-se que tanto as células mistas como os astrócitos isolados também exercem influência sobre a expressão protéica do MITF e BRN2 pelo melanoma, através de fatores solúveis (Figura 30). Os fatores solúveis produzidos pelas células mistas foram capazes de induzir a redução de MITF nas primeiras 24 horas, enquanto

os fatores oriundos especificamente dos astrócitos tiveram influência significativa mais tardia, com 48 horas de exposição, ambos nas três linhagens de melanoma.

Esse mesmo MC de células mistas e de astrócitos também foi capaz de induzir o aumento na expressão protéica de BRN2 pelas células de melanoma, sendo mais intenso o efeito do microambiente representado pelas células mistas, aumentando a quantidade de células positivas para o fator de transcrição em quase todas as condições. Os resultados também mostraram que os astrócitos produziram um efeito mais heterogêneo, tanto entre as condições como entre as linhagens, apesar de também induzirem o aumento da expressão.

Diante desses resultados, percebe-se que os astrócitos atuam facilitando a metástase ao reduzir a capacidade de diferenciação, proliferação e senescência que o MITF confere às células de melanoma, feito que o microambiente como um todo não é capaz de fazer nas interações diretas iniciais da co-cultura. Entretanto, os astrócitos não são capazes de isoladamente interferir na expressão protéica do BRN2, responsável de fato pelo perfil metastático e invasivo, além das 24 horas iniciais, onde o microambiente foi muito mais eficaz em permitir que o melanoma alterasse seu perfil em relação à expressão desse fator de transcrição.

Sendo o BRN2 um dos principais reguladores da expressão do MITF, além do próprio microambiente, como os astrócitos, entende-se que é necessário inicialmente haver um aumento na sua expressão para que, posteriormente, num perfil BRN2^{HIGH}, o MITF seja reduzido para um perfil MITF^{LOW} (AHMED; HAASS, 2018; WELLBROCK; AROZARENA, 2015a). Ao mesmo tempo, entende-se que na heterogeneidade intrínseca intratumoral do melanoma, a flexibilidade comportamental pode não refletir esse perfil fenotípico, onde num status de invasão a repressão de BRN2 sobre MITF pode ser suspensa, prevalecendo então características reguladas pelo MITF como proliferação e crescimento no sítio metastático (PINNER et al., 2009). Análises da expressão de proteínas como E-caderina, N-caderinas e Vimentina poderiam elucidar melhor qual o comportamento fenotípico durante o estabelecimento da metástase das linhagens de melanoma utilizadas.

Em relação ao efeito inverso, do MC de linhagens de melanoma sobre culturas primárias, foi possível observar a expressão protéica de MITF pelos astrócitos, especialmente após exposição por 48 horas aos fatores solúveis tumorais (Figura 29). Essa mesma expressão não foi detectada quando as células mistas estavam expostas ao MC de melanomas, mostrando que é uma interação específica com os astrócitos.

O papel dos astrócitos no estabelecimento da metástase cerebral ainda permanece dual, posto que inicialmente eles parecem tentar proteger o córtex cerebral das células invasoras, ao

secretarem moléculas indutoras de apoptose (VALIENTE et al., 2014), mas ao mesmo tempo secretam heparanase e interleucina-23, as quais facilitam a passagem das células tumorais pela BHE (KLEIN et al., 2015; MARCHETTI; LI; SHEN, 2000; MURRY et al., 2006). Entretanto, os astrócitos presentes mais próximos da BHE são os mais influenciados pelas células tumorais e pelos fatores solúveis que as mesmas liberam com a finalidade de induzir as células do nicho pré-metastático a facilitarem sua passagem e o estabelecimento do processo metastático (TUCCI et al., 2018). Induzir os astrócitos a expressarem um fator de transcrição do melanoma pode ser uma das vias que esse tumor utiliza para se beneficiar do importante papel dos astrócitos no cérebro.

De Oliveira Barros e colaboradores (2014) também fizeram um ensaio analisando o efeito do MC de células de próstata sobre astrócitos, encontrando redução de proliferação. Entretanto, nenhuma variação morfológica ou de marcadores celulares específicos do tumor de próstata em estudo sendo expressos pelas células da glia foi relatado (DE OLIVEIRA BARROS et al., 2014).

Apesar do MC das linhagens tumorais não ter alterado a expressão do marcador de proliferação KI67 pelas células da cultura primária, o efeito contrário foi observado. O MC oriundo de células mistas e de astrócitos aumentou a proliferação das linhagens de melanoma, enquanto reduziu a proliferação de PANC-1 (Figuras 31 e 32). Os astrócitos tiveram maior influência na proliferação dos melanomas quando seu MC foi exposto por 24 e 48 horas, não tendo significância na exposição de 48 horas. Já a células mistas, tiveram maior indução da proliferação nas três linhagens apenas nas 24 horas iniciais.

Este resultado sugere que talvez os astrócitos presentes mais próximos da BHE possam de forma mais próxima das células tumorais exercer um aumento na proliferação das células tumorais logo quando elas atravessam a barreira. Essa hipótese também se relaciona com o fato de que os astrócitos foram mais influentes na redução da expressão do MITF, que além de regulador da proliferação, também é regulador da senescência celular tumoral que caracteriza essas células tumorais circulantes pré-metastáticas (AROZARENA; WELLBROCK, 2017; FERRETTA et al., 2016).

A capacidade das células do nicho pré-metastático diferenciarem tumores que metastizariam naquele nicho, favorecendo assim sua proliferação ou não, já havia sido demonstrada. De Oliveira Barros e colaboradores (2014), analisou o efeito do MC de astrócitos isolados sobre a proliferação de uma linhagem de tumor de próstata e uma de células de linfonodo saudáveis. Neste trabalho, verificou-se que os fatores solúveis liberados pelos

astrócitos favoreceram a proliferação do câncer de próstata, apenas a partir de 48 horas, e não tiveram efeito sobre as células saudáveis (DE OLIVEIRA BARROS et al., 2014).

Através da análise da presença de TGF- β , esse mesmo grupo mostrou que esse fator é o responsável pela supressão tumoral nas primeiras 24 horas, enquanto que a partir das 48 horas de exposição o fator é reduzido e a proliferação é então aumentada de forma significativa (DE OLIVEIRA BARROS et al., 2014). No caso do presente trabalho, em nenhuma condição o MC de células mistas ou de astrócitos não favoreceu a proliferação dos melanomas na interação indireta, podendo ser um diferencial para essa metástase, visto que tumores de próstata têm taxas muito baixas de metástase cerebral (FERLAY et al., 2015; INCA, 2017).

Do mesmo modo, apesar de MITF ser um dos reguladores do processo proliferativo do melanoma, também já foi demonstrado que sua redução na expressão não significa redução na proliferação (VLČKOVÁ et al., 2018). Assim como vimos no nosso trabalho, onde houve uma redução de MITF nos melanomas expostos ao MC de células primárias, mas um aumento da proliferação nesses mesmos melanomas expostos a esse mesmo MC. Paralelo à redução de MITF durante o aumento da proliferação, também foi visto o aumento de BRN2 quando as células de melanoma foram expostas ao MC de células primárias, assim como já foi demonstrado que o BRN2 também pode controlar o processo proliferativo dos melanomas (GOODALL et al., 2004).

Sendo a migração tumoral outro passo essencial para o estabelecimento da metástase, o trabalho também se propôs a analisar o possível efeito do favorecimento migratório que o MC de células primárias poderia exercer sobre as linhagens tumorais (Figura 33). A redução da porcentagem de área livre reflete a capacidade migratória das células tumorais. Enquanto o MC de astrócitos isolados e células mistas não promoveu nenhuma alteração na migração das células tumorais pancreáticas, o mesmo não ocorreu com as linhagens de melanoma.

Os astrócitos isolados demonstraram novamente ter um papel crucial no nicho pré-metastático ao induzir a migração das três linhagens de melanoma, ao passo que as células mistas do microambiente cerebral induziram a migração da A375 e SKMEL-28. O papel do BRN2 no processo migratório ainda é controverso na literatura. Fane et al. reportaram que o BRN2 seria crucial para o processo migratório das células de melanoma, corroborando nossos achados onde o mesmo MC de células primárias que aumentou a expressão desse fator de transcrição também aumentou a migração tumoral (FANE et al., 2017b). Por outro lado, Simmons et al., demonstraram que MITF seria o fator mais importante para a migração, onde

a mesma foi analisada durante o silenciamento de BRN2, sendo necessária a presença significativa do MITF (SIMMONS et al., 2017).

Além da importância do estudo da metástase cerebral, o presente trabalho também analisou a potencial atividade antitumoral de um derivado imidazacridínico contra o melanoma. Inicialmente, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* demonstrou que o AC05 é citotóxico e seletivo contra a linhagem UACC62 (IS=3,53), sem alterar a viabilidade celular da cultura mista (Figura 34).

Chagas, 2016, havia demonstrado que o derivado imidazacridínico é citotóxico contra linhagens de câncer de mama MCF-7 ($IC_{50} = 42\mu M$), MDA-MB231 ($IC_{50} = 27,5\mu M$) e MCF-10A ($IC_{50} = 28,5\mu M$), apresentando $IS > 3$ para as duas últimas linhagens. O trabalho também mostrou que o mecanismo de ação induzido após o tratamento com o composto na sua dose de IC_{50} contra a MDA-MB231 se deu através de indução da morte por apoptose e arraste do ciclo celular. Contra linhagens de leucemia e linfoma, o AC05 além de ser citotóxico e seletivo, também atuou por meio da apoptose, arrasto do ciclo celular e inibição da atividade da Topoisomerase II (CHAGAS, 2016).

No presente trabalho, a análise da expressão protéica após o tratamento com o AC05 durante 48 horas mostrou que o derivado induziu o aumento da expressão de supressores tumorais como PAR-4 e BID, embora os resultados sejam preliminares (Figura 35). Martins, 2017, analisou por expressão gênica proteínas relacionadas às possíveis vias de morte utilizadas pelo AC05 contra a linhagem UACC62, demonstrando que após 6 horas de tratamento na concentração de IC_{50} , o AC05 induziu apoptose das células de melanoma, aumentando a expressão de PAR-4 em 8 vezes, BID em 6 vezes e p53 em 5,5 vezes, todas em relação ao não tratado (MARTINS, 2017 dados ainda não publicados).

PAR-4 (do inglês: *Prostate apoptosis response-4*) é um gene pró-apoptótico, relacionado à inibição da proliferação celular de câncer de mama e de próstata, dentre outros, devido à sua capacidade seletiva de promover apoptose apenas de células tumorais (BURIKHANOV et al., 2009; PEREIRA et al., 2013). Há pouquíssimos estudos relacionando o PAR-4 no melanoma, mas Lucas et al. demonstraram que a indução da superexpressão do PAR-4 foi capaz de reduzir o desenvolvimento tumoral de células A375 em um xenoinxerto (LUCAS et al., 2001).

PAR-4 seletivamente induz a morte celular de células tumorais por diversas vias: através da translocação de Fas ligante para a membrana celular, através da ativação de caspases 3 e 8 após ligação com GRP78, pela clivagem de BID, resultando na ativação de Bax, pela inibição

de proteínas relacionadas à sobrevivência celular como PKC e Akt (SANTOS et al., 2019). A maior expressão e localização nuclear de PAR-4 em tumores de mama têm sido relacionados ao processo apoptótico, bem como à redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (CHEEMA et al., 2003).

No presente trabalho, o tratamento do AC05 em células de melanoma também provocou o aumento de Bcl-2, como resultado preliminar. BCL-2 é uma família de genes que regulam o balanço entre vida e morte celular, tendo proteínas pró- e anti-apoptóticas (WALENSKY, 2019; YOULE; STRASSER, 2008). A proteína Bcl-2 está presente na membrana externa mitocondrial e é relacionada às vias anti-apoptóticas, as quais são associadas à mutação BRAF do melanoma, sendo resultado da ativação da cascata de fosforilação de RAS-MEK-ERK (CHIPUK, 2015; YOULE; STRASSER, 2008).

O aumento de uma proteína responsável por uma via anti-apoptótica pode ser resultado da reação tumoral devido ao aumento de proteínas pró-apoptóticas induzido pelo AC05. Serasinghe et al., já demonstraram que frente a um tratamento antitumoral que induz morte por apoptose, o tumor pode reagir ativando outras vias, como a Bcl-2, como um mecanismo de defesa (SERASINGHE et al., 2015). A presença de MITF também já foi relacionada com a ativação de vias indutoras da expressão de Bcl-2, como proteção do tumor (NAJEM et al., 2017).

BID (do inglês: *BH3 Interacting-domain Death agonist*) também é um gene relacionado à indução de morte, o qual ao ser clivado, ativa outras duas moléculas da família BCL-2, Bax e BAK, responsáveis pela formação do aptossomo na via apoptótica (ICHIM; TAIT, 2016). Da mesma forma, p53 é um conhecido supressor tumoral por ter importantes funções no controle da sobrevivência celular e mecanismos de reparos no DNA (RAY et al., 2016). No melanoma, já foi demonstrado que novas abordagens terapêuticas que resultam no aumento de p53 e Bax têm promissor potencial antitumoral, servindo também de marcadores de prognóstico (RAMADAN et al., 2019).

Apesar de serem resultados preliminares, se confirmados, o aumento desses supressores tumorais pelo AC05 corrobora o potencial de sua atividade antineoplásica frente ao melanoma e traz luz a alguns mecanismos de ação desse composto que devem ser investigados.

No ensaio *in vivo*, o derivado reduziu significativamente o volume e o peso dos tumores inoculados nos animais (Figura 36). De acordo com a metodologia, o ensaio *in vivo* deve prosseguir até que algum animal alcance o volume tumoral de 1cm³ ou que por questões éticas decida-se interromper o método. Os tratamentos chegaram a durar um máximo de duas

semanas, mas mesmo em pouco tempo, o AC05 demonstrou significativa redução da velocidade de crescimento dos tumores ($p < 0.0001$).

Guillermo-Lagae e colaboradores (2017) demonstraram um tratamento com um fitoquímico chamado *honokiol* ($C_{18}H_{18}O_2$), durante duas semanas, o qual também reduziu o crescimento tumoral de UACC62 em camundongo, mas com uma significância mais branda ($p < 0,5$) e onde foi permitido que os tumores crescessem até 3cm^3 (GUILLERMO-LAGAE et al., 2017). Du e colaboradores (2014), também utilizando um modelo xenográfico com UACC62 em camundongos, analisaram o tratamento desses animais com um metabólito de fungos chamado Preussiadina A. O trabalho demonstrou uma ótima atividade antitumoral previamente *in vitro*, mas *in vivo* provocou diversos efeitos colaterais nos animais como perda de peso e desnutrição e, em sua dose máxima tolerada não promoveu redução no crescimento tumoral de forma significativa (DU et al., 2014).

A análise das imagens em HE (Figura 37) representando as extensas áreas necróticas no grupo tratado com o AC05 juntamente com a presença de infiltrado de linfócitos sugere que o composto ative uma resposta imune, vista nesse infiltrado. Tal achado pode significar uma defesa imunogênica ativada pelo tratamento, fortalecendo o sistema imunológico do indivíduo ao passo que afeta o tumor de uma forma geral.

Nas últimas décadas, os modelos animais com xenoenxertos em camundongos nude têm proporcionado um grande avanço nos estudos para descoberta de novos agentes com efeitos antitumorais, além da biologia tumoral de forma geral. As vantagens de um modelo xenográfico é a possibilidade do uso de células tumorais humanas, permitindo a predileção da resposta tumoral humana às drogas que estão sendo testadas (KUZU et al., 2015).

Outra vantagem é a facilidade de desenvolvimento do modelo e a produção de resultados em poucas semanas-meses. Entretanto, se por um lado, a imunodeficiência é uma vantagem para o rápido desenvolvimento do modelo, este mesmo fator é uma desvantagem no quesito de geração de um microambiente adequado, exatamente pela falta das interações com o sistema imunológico, o qual sabe-se que participa ativamente do processo metastático (IZRAELY et al., 2018; JANSSEN et al., 2017; SANMAMED et al., 2016). De forma geral, o alto custo para geração, criação e manutenção desses animais ainda é o maior obstáculo para seu uso de forma mais abrangente.

Os diversos modelos existentes, tanto *in vitro* como *in vivo*, apresentam cada qual sua particularidade com vantagens e limitações, não existindo um único modelo que sirva a todas as necessidades e que seja acessível à todas as frentes de pesquisa contra o câncer primário e a

metástase. Assim, o presente trabalho, se propôs a tratar a co-cultura de UACC62 sobre a cultura primária com o derivado imidazacridínico AC05, dada sua atividade antitumoral contra essa linhagem de melanoma isolada.

Os resultados iniciais mostraram que o tratamento de 48 horas no microambiente composto pelas células mistas apresentou melhores resultados antineoplásicos do que quando o tratamento foi na co-cultura apenas sobre os astrócitos isolados, em relação à expressão do marcador de proliferação KI67 (Figura 38). Essa mesma condição de tratamento no microambiente celular misto também mostrou uma realocação do PAR-4 nas células de melanoma, do citoplasma para o núcleo (Figura 39). A translocação de PAR-4 induzida pelo AC05 no modelo de metástase, bem como os resultados anteriores de Martins, 2017, onde o AC05 aumentava a expressão do gene responsável pela produção de PAR-4 indica a ativação de uma importante via de morte por esse derivado imidazacridínico.

O estudo do processo metastático no cérebro é mais reportado na literatura através de co-culturas sobre os astrócitos (CHEN et al., 2016; DE OLIVEIRA BARROS et al., 2014; LANGLEY; FIDLER, 2013) . É inegável que os astrócitos têm um papel essencial nessa progressão tumoral, entretanto a interrelação dos mesmos com as demais células no cérebro também é essencial. Diante da tamanha importância dos astrócitos no tecido cerebral, certamente o resultado de sua interação com células tumorais também é dependente e influenciadora das interações com as demais células do microambiente metastático.

Comparar o papel dos astrócitos quando interagem com as células tumorais, direta ou indiretamente, de forma isolada e dentro do microambiente foi o principal resultado do trabalho aqui apresentado. Ao mostrar que os astrócitos no microambiente, o qual de fato interage com o tumor, apresenta resultados diferentes de quando as interações são isoladas mostrou, mais uma vez, a importância do estudo do microambiente com todas as células, componentes da matriz extracelular e demais moléculas que participam ativamente do estabelecimento do processo pré e metastático.

6 CONCLUSÃO

Entender o processo metastático, na complexidade específica de cada subpopulação tumoral e cada nicho metastático possível, é uma das questões mais urgentes dentro da problemática do câncer atualmente. Um modelo de metástase cerebral de melanoma para ser utilizado como ferramenta terapêutica, precisa ser caracterizado inicialmente em suas particularidades celulares, dadas suas limitações como modelo de estudo.

O cérebro como nicho pré-metastático foi caracterizado no modelo quanto aos seus componentes celulares, neurônios e astrócitos, bem como quanto a demais marcadores como proliferativo, através do KI67, e da presença de células com potencial de diferenciação, através da Nestina. Com o ambiente metastático estabelecido, as co-culturas sobre células mistas e astrócitos isolados também apresentaram os marcadores dos componentes celulares.

Além disso, a caracterização das co-culturas demonstrou que o modelo tem características comuns aos modelos *in vivo* e demais modelos *in vitro* demonstrados na literatura, especialmente no que concerne à expressão de MITF e BRN2. A expressão de tais fatores de transcrição de acordo com o processo metastático foi imprescindível, dada a importância dos mesmos como principais reguladores da TEM do melanoma.

A análise do efeito dos fatores solúveis do tumor primário sobre o nicho pré-metastático mostrou que o melanoma é capaz de modular os astrócitos para que os mesmos passem a expressar o MITF, podendo servir como importante instrumento para o estabelecimento da metástase nesse nicho.

Por sua vez, o nicho pré-metastático cerebral também foi capaz de influenciar o tumor primário em importantes processos pré-metastáticos como proliferação e migração tumorais, onde os astrócitos isolados exerceram maior influência que as células mistas. Tal modulação ainda se mostrou seletiva, ao não ter os mesmos efeitos sobre PANC-1, uma linhagem que não tem o cérebro como sítio metastático comum.

Paralelamente, a análise do derivado imidazacridínico AC05 no contexto antitumoral mostrou uma seletividade citotóxica para a linhagem UACC62 *in vitro*, enquanto não teve efeito sobre a viabilidade celular das células cerebrais. A análise da expressão protéica após 48 horas de tratamento mostrou uma maior expressão de proteínas relacionadas à supressão tumoral, a saber PAR-4 e BID. No modelo animal, o derivado em estudo se mostrou capaz de reduzir a velocidade de crescimento tumoral *in vivo*, demonstrando seu potencial contra o melanoma primário agressivo.

A fim de validar o modelo de metástase cerebral como possível ferramenta terapêutica, a imunofluorescência demonstrou que o AC05 reduziu a expressão de um marcador de

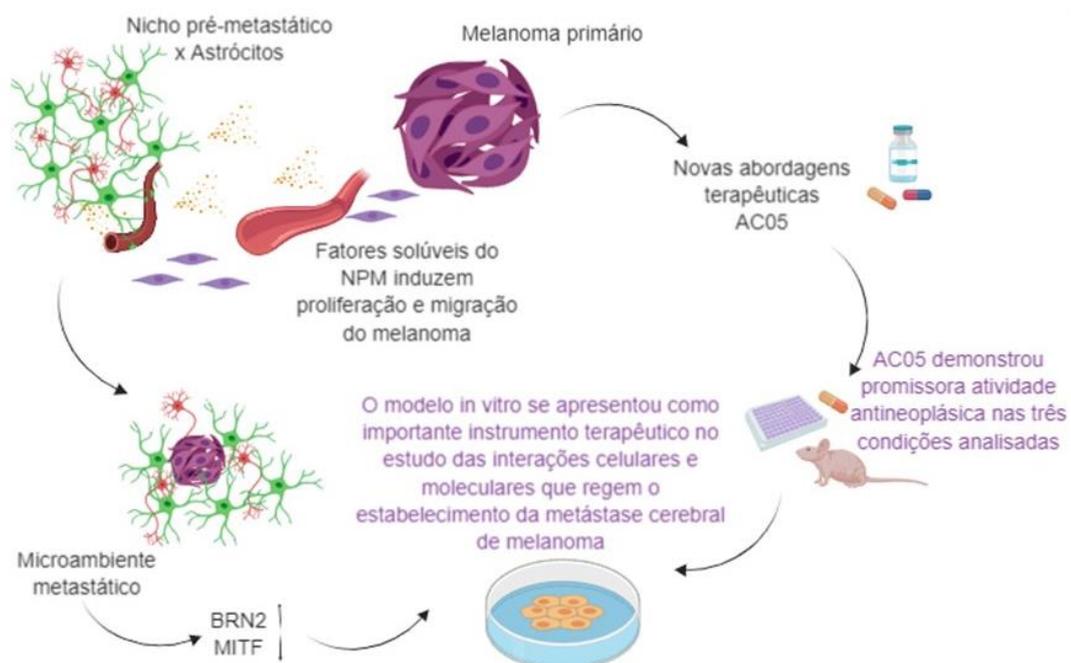
proliferação celular apenas na co-cultura com células mistas. Tal resultado, juntamente com a realocação de um importante marcador de supressão tumoral do citoplasma para o núcleo também apenas nas co-culturas sobre células mistas reforçam o papel do microambiente como colaborador ativo das abordagens terapêuticas utilizadas.

Os estudos *in vitro* reportados na literatura trazem o papel dos astrócitos isolados em co-culturas com o melanoma, a fim de analisar seu papel na metástase. Entretanto, a partir dos resultados aqui apresentados, o diferencial de uma cultura mista mostrou toda a influência do microambiente, inclusive a influência real dos astrócitos, os quais demonstraram resultados distintos de quando analisados isoladamente.

O mesmo modelo *in vitro* se mostrou útil como ferramenta terapêutica em ensaios iniciais sobre a atividade antitumoral e antimetastática de um novo composto. Por sua vez, o derivado imidazacridínico AC05 se apresentou com um promissor potencial antineoplásico, tanto contra melanomas primários, como na complexidade metastática, ao ativar importantes vias de morte celular, mesmo necessitando ainda de estudos mais aprofundados acerca de seu mecanismo de ação.

Concluí-se assim que o modelo aqui proposto e caracterizado pode ser utilizado como ferramenta no estudo do comportamento da metástase cerebral de melanoma, bem como para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra essa patologia. Da mesma forma, os efeitos antitumorais do AC05 contra o melanoma primário e na metástase atingiram o resultado esperado e merecem ser analisados a nível de mecanismo de ação.

Figura 40. Imagem representativa da conclusão.



Fonte: Própria autora (Biorender).

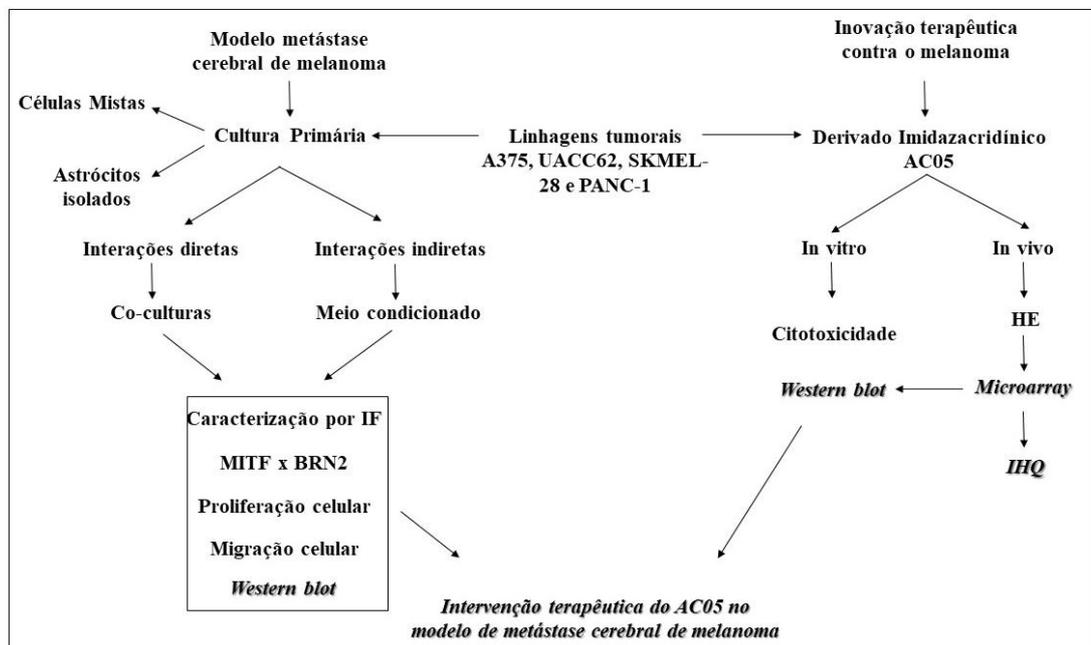
7 PERSPECTIVAS

Para finalizar as análises quantitativas referentes à caracterização do modelo de metástase cerebral de melanoma, faz-se necessário quantificar as proteínas MITF e BRN2 pela técnica de western blotting, bem como outras proteínas presentes na transição epitélio-mesênquima como caderinas e vimentina, MMPs e supressores tumorais como o PAR4.

Em relação à avaliação da atividade antineoplásica do derivado imidazacridínico frente ao melanoma *in vivo*, uma análise pela técnica de *microarray* está sob análise das principais vias moduladas pelo AC05, para posterior validação através de imuno-histoquímica e western blotting. Assim, será possível entender como o AC05 promove a morte do melanoma primário, dentro das características da linhagem UACC62.

Após estes resultados será possível aprofundar as análises sobre o potencial antitumoral do AC05 dentro do modelo de metástase estabelecido e caracterizado, validando também sua utilização como ferramenta terapêutica para o estudo desse problema de saúde pública tão alarmante.

Figura 41. Fluxograma dos materiais métodos utilizados nas perspectivas em itálico.



REFERÊNCIAS

- ABILDGAARD, C.; GULDBERG, P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 3, p. 164–171, 2015.
- ADDEO, R. et al. Chemotherapy in the management of brain metastases: the emerging role of fotemustine for patients with melanoma and NSCLC. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 12, n. 5, p. 729–740, 2013.
- AHMED, F.; HAASS, N. K. Microenvironment-Driven Dynamic Heterogeneity and Phenotypic Plasticity as a Mechanism of Melanoma Therapy Resistance. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. Article 173, p. 1–7, 2018.
- AIDA, S. et al. MITF suppression by CH5552074 inhibits cell growth in melanoma cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, p. 1–7, 2017.
- AKASAKA, K. et al. Loss of Class III β -Tubulin Induced by Histone Deacetylation Is Associated with Chemosensitivity to Paclitaxel in Malignant Melanoma Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 6, p. 1516–1526, 2009.
- ALEČKOVIĆ, M.; KANG, Y. Welcoming Treat: Astrocyte-Derived Exosomes Induce PTEN Suppression to Foster Brain Metastasis. **Cancer Cell**, v. 28, n. 5, p. 554–556, 2015.
- AMELOT, A. et al. Timeline metastatic progression: in the wake of the « seed and soil » theory. **Medical Oncology**, v. 34, n. 185, p. 1–8, 2017.
- AROZARENA, I.; WELLBROCK, C. Targeting invasive properties of melanoma cells. **The FEBS Journal**, p. 1–15, 2017.
- ARRIGONI, C. et al. In vitro co-culture models of breast cancer metastatic progression towards bone. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 2016.
- ASWAD, H.; JALABERT, A.; ROME, S. Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. **BMC biotechnology**, v. 16, p. 32, 2016.
- ATKINS, M. B. et al. Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): A trial coordin. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 35, p. 5748–5754, 2008.
- AURRAND-LIONS, M. et al. Junctional Adhesion Molecule-C Regulates the Early Influx of Leukocytes into Tissues during Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 10, p. 6406–6415, 2005.
- BAI, G. R. et al. Comparison of the effectiveness of whole-brain radiotherapy plus temozolomide versus whole-brain radiotherapy in treating brain metastases based on a systematic review of randomized controlled trials. **Anti-Cancer Drugs**, v. 27, n. 1, p. 1–8, 2016.
- BALLOTTI, R.; BERTOLOTTI, C. Deregulated MITF sumoylation : A route to melanoma. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 4, n. 4, p. 1–2, 2017.
- BANDARCHI, B. et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatology Research and Practice**, v. 2010, n. 1, 2010.

BARROS, F. W. A. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new acridine-thiazolidine derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 20, n. 11, p. 3533–3539, 2012.

BENNETT, D. C. Ultraviolet wavebands and melanoma initiation. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 21, n. 5, p. 520–524, 2008.

BERSINI, S. et al. A microfluidic 3D invitro model for specificity of breast cancer metastasis to bone. **Biomaterials**, v. 35, n. 8, p. 2454–2461, 2014a.

BERSINI, S. et al. In vitro models of the metastatic cascade: from local invasion to extravasation. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 6, p. 735–742, 2014b.

BOISSY, R. E. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. **Experimental Dermatology**, v. 12, n. s2, p. 5–12, 2003.

BOLLAG, G. et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. **Nature**, v. 467, n. 3, p. 596–599, 2010.

BONSE, S. et al. Inhibition of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase by acridines: Kinetic studies and structure-activity relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 26, p. 5448–5454, 1999.

BUDDEN, T.; BOWDEN, N. A. The role of altered nucleotide excision repair and UVB-induced DNA damage in melanomagenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1132–1151, 2013.

BURIKHANOV, R. et al. A Novel Extrinsic Pathway for Apoptosis by Tumor Suppressor Par-4. **Cell**, v. 138, n. 2, p. 377–388, 2009.

CAGNEY, D. N. et al. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. 11, p. 1511–1521, 2017.

CARREIRA, S. et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. **Genes and Development**, v. 20, n. 24, p. 3426–3439, 2006.

CATERINA, M. C. et al. Imidazolidines as new anti-Trypanosoma cruzi agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 2226–2234, 2008.

CHAGAS, M. B. DE O. **Avaliação da Atividade Anticâncer e Mecanismo de Ação de Novos Agentes Acridínicos**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

CHANG, Y. M. et al. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: A pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. **International Journal of Epidemiology**, v. 38, n. 3, p. 814–830, 2009.

CHAPMAN, B. P. B. et al. Phase III Multicenter Randomized Trial of the Dartmouth Regimen Versus Dacarbazine in Patients With Metastatic Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 9, p. 2745–2751, 1999.

CHEEMA, S. K. et al. Par-4 transcriptionally regulates bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 22, p. 19995–20005, 2003.

CHEN, K. et al. New benzimidazole acridine derivative induces human colon cancer cell apoptosis in vitro via the ROS-JNK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 9, p. 1074–1084, 2015.

CHEN, Q. et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. **Nature**, v. 533, n. 7604, p. 493–8, 2016.

CHEN, T. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation and tumorigenesis. **Journal of Cell Physiology**, v. 232, n. 12, p. 3261–3272, 2017.

CHIPUK, J. E. BCL-2 proteins: melanoma lives on the edge. **Oncoscience**, v. 2, n. 9, p. 729–730, 2015.

CICENAS, J. et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. **Medical Oncology**, v. 34, n. 2, p. 26, 2017.

CLARK, W. H. et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology**, v. 15, n. 12, p. 1147–1165, 1984.

COCKERHAM, W. C.; HAMBY, B. W.; OATES, G. R. The Social Determinants of Chronic Disease. **American Journal of Prevention Medicine**, v. 52, n. 1, p. S5–S12, 2017.

COGHLIN, C.; MURRAY, G. I. Current and emerging concepts in tumour metastasis. **Journal of Pathology**, v. 222, p. 1–15, 2010.

COMMANDEUR, S. et al. In-vitro melanoma models: Invasive growth is determined by dermal matrix and basement membrane. **Melanoma Research**, v. 24, n. 4, p. 305–314, 2014.

CORREA, D. et al. Mesenchymal stem cells regulate melanoma cancer cells extravasation to bone and liver at their perivascular niche. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 2, p. 417–427, 2016.

CUYLEN, S. et al. Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. **Nature**, v. 535, n. 7611, p. 308–312, 2016.

DA ROCHA PITTA, M. G. et al. Synthesis and in vitro anticancer activity of novel thiazacridine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 5, p. 2421–2429, 2013.

DAMSKY, W. E.; ROSENBAUM, L. E.; BOSENBERG, M. Decoding melanoma metastasis. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 126–163, 2011.

DAMSKY, W.; THEODOSAKIS, N.; BOSENBERG, M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. **Oncogene**, v. 33, n. April, p. 2413–2422, 2013.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–954, 2002.

DE GROOT, A. E. et al. Revisiting Seed and Soil: Examining the Primary Tumor and Cancer Cell Foraging in Metastasis. **Molecular and Cancer Research**, v. 15, n. 4, p. 361–370, 2017.

DE OLIVEIRA BARROS, E. G. et al. The reciprocal interactions between astrocytes and prostate cancer cells represent an early event associated with brain metastasis. **Clinical & experimental metastasis**, v. 31, p. 461–474, 1 mar. 2014.

DE VELLIS, J.; COLE, R. Preparation of mixed culture from post natal rat brains. **Astrocytes**, p. 49–59, 2012.

DI GIACOMO, A. M. et al. Three-year follow-up of advanced melanoma patients who received ipilimumab plus fotemustine in the Italian Network for Tumor Biotherapy (NIBIT)-M1 phase II study. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 4, p. 798–803, 2015.

- DOMINGUEZ, M. H.; AYOUB, A. E.; RAKIC, P. POU-III transcription factors (Brn1, Brn2, and Oct6) influence neurogenesis, molecular identity, and migratory destination of upper-layer cells of the cerebral cortex. **Cerebral Cortex**, v. 23, n. 11, p. 2632–2643, 2013.
- DONALDSON, I. J. et al. Proneural bHLH and Brn Proteins Coregulate a Neurogenic Program through Cooperative Binding to a Conserved DNA Motif. **Developmental Cell**, v. 11, n. 6, p. 831–844, 2006.
- DRE, B. Incidence and characteristics of melanoma brain metastases developing during treatment with vemurafenib. p. 147–154, 2014.
- DU, L. et al. Cytotoxic dimeric epipolythiodiketopiperazines from the ascomycetous fungus *Preussia typharum*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 6, p. 1459–1466, 2014.
- EGGERMONT, A. M. M.; KIRKWOOD, J. M. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What have we learned in 30 years? **European Journal of Cancer**, p. 1825–1836, 2004.
- EITER, L. C. et al. Gold(I) Analogues of a Platinum-Acridine Antitumor Agent are only Moderately Cytotoxic but Show Potent Activity Against *Mycobacterium Tuberculosis*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 21, p. 6519–6522, 2009.
- ELSHOLZ, F. et al. Calcium - A central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. **European Journal of Dermatology**, v. 24, n. 6, p. 650–661, 2014.
- ENG, L. F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 8, n. C, p. 203–214, 1985.
- ENNEN, M. et al. MITF -High and MITF -Low Cells and a Novel Subpopulation Expressing Genes of Both Cell States Contribute to Intra- and Intertumoral Heterogeneity of Primary Melanoma. **Clinical Cancer Research**, n. 15, p. 7097–7108, 2017.
- EVANS, J. P. et al. From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 94–105, 2015.
- FABI, A. et al. Brain metastases from solid tumors: Disease outcome according to type of treatment and therapeutic resources of the treating center. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 10, 2011.
- FANE, M. E. et al. NFIB Mediates BRN2 Driven Melanoma Cell Migration and Invasion Through Regulation of EZH2 and MITF. **EBioMedicine**, v. 16, p. 63–75, 2017a.
- FANE, M. E. et al. NFIB Mediates BRN2 Driven Melanoma Cell Migration and Invasion Through Regulation of EZH2 and MITF. **EBioMedicine**, v. 16, p. 63–75, 2017b.
- FANE, M. E. et al. BRN2, a POUerful driver of melanoma phenotype switching and metastasis. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 32, n. 1, p. 9–24, 2019.
- FENG, S. et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- FERGUSON, J. et al. Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 32946–32959, 2017.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major

patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.

FERRETTA, A. et al. New insight into the role of metabolic reprogramming in melanoma cells harboring BRAF mutations. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 11, p. 2710–2718, 2016.

FIDLER, I. J. et al. Astrocytes Upregulate Survival Genes in Tumor Cells and Induce Protection from Chemotherapy. **Neoplasia**, v. 13, n. 3, p. 286–298, 2015.

FISHER, D. E. et al. Hypoxia-induced transcriptional repression of the melanoma-associated oncogene MITF. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 43, p. E924–E933, 2011.

FONKEM, E. et al. Melanoma brain metastasis: Overview of current management and emerging targeted therapies. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 12, n. 10, p. 1207–1215, 2012.

FRANCHINO, F.; RUDÀ, R.; SOFFIETTI, R. Mechanisms and Therapy for Cancer Metastasis to the Brain. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. May, 2018.

FUKUNAGA-KALABIS, M. et al. UV-induces Wnt7a in the human skin microenvironment specifies the fate of neural crest-like cells via suppression of Notch. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 6, p. 1521–1532, 2015.

GADELIYA GOODSON, A.; GROSSMAN, D. Strategies for early melanoma detection: Approaches to the patient with nevi. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 5, p. 719–735, 2009.

GALDINO-PITTA, M. et al. Niche for acridine derivatives in anticancer therapy. **Mini Review Med Chem**, v. 13, n. 9, p. 1256–1271, 2013.

GALLI, G. et al. Combination of Immunotherapy and Brain Radiotherapy in Metastatic Melanoma: A Retrospective Analysis. **Oncology Research and Treatment**, p. 1–6, 2019.

GEMMA, S. et al. Synthesis of N1-arylidene-N2-quinolyl- and N2-acrydinylhydrazones as potent antimalarial agents active against CQ-resistant *P. falciparum* strains. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 20, p. 5384–5388, 2006.

GHOSH, R. et al. Chemotherapeutic potential of 9-phenyl acridine: Biophysical studies on its binding to DNA. **European Biophysics Journal**, v. 39, n. 8, p. 1243–1249, 2010.

GIRAULT, S. et al. Antimalarial, Antitrypanosomal, and Antileishmanial Activities and Cytotoxicity of Bis(9-amino-6-chloro-2-methoxyacridines): Influence of the Linker. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2646–2654, 2000.

GLEAVE, R. J. et al. Synthesis and biological activity of a series of tetrasubstituted-imidazoles as P2X7 antagonists. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 16, p. 4951–4954, 2010.

GOLAN, T. et al. Interactions of Melanoma Cells with Distal Keratinocytes Trigger Metastasis via Notch Signaling Inhibition of MITF. **Molecular Cell**, v. 59, n. 4, p. 664–676, 2015.

GOLDSTEIN, A. M. et al. Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 12, p. 1006–10, 2000.

- GOODALL, J. et al. Brn-2 expression controls melanoma proliferation and is directly regulated by beta-catenin. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 7, p. 2915–22, 2004.
- GOODALL, J. et al. Brn-2 Represses Microphthalmia-Associated Transcription Factor Expression and Marks a Distinct Subpopulation of Microphthalmia-Associated Transcription Factor – Negative Melanoma Cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, p. 7788–7795, 2008.
- GUILLERMO-LAGAE, R. et al. Antineoplastic Effects of Honokiol on Melanoma. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–10, 2017.
- GURSKI, L. A. et al. Hyaluronan (HA) Interacting Proteins RHAMM and Hyaluronidase Impact Prostate Cancer Cell Behavior and Invadopodia Formation in 3D HA-Based Hydrogels. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.
- HAASS, N. K. et al. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 18, n. 3, p. 150–159, 2005.
- HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, n. 2, p. 153–163, 2005.
- HACHIYA, A. et al. Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. **Epithelial and Mesenchymal Cell Biology**, v. 165, n. 6, p. 2099–2109, 2004.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HANIBUCHI, M. et al. The molecular biology of lung cancer brain metastasis: an overview of current comprehensions and future perspectives. **The Journal of Medical Investigation**, v. 61, n. 3.4, p. 241–253, 2014.
- HARTMAN, M. L.; CZYZ, M. Pro-Survival Role of MITF in Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 352–358, 2014.
- HASSEL, J. C. Ipilimumab plus nivolumab for advanced melanoma. **The Lancet Oncology**, v. 2045, n. 16, p. 8–9, 2016.
- HODIS, E. et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 251–263, 2012.
- HOEK, K. S.; GODING, C. R. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 23, p. 746–759, 2010.
- HUANG, Y. T. et al. The neuronal POU transcription factor Brn-2 interacts with Jab1, a gene involved in the onset of neurodegenerative diseases. **Neuroscience Letters**, v. 382, n. 1–2, p. 175–178, 2005.
- ICHIM, G.; TAIT, S. W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nature Review Cancer**, v. 16, n. 8, p. 539–548, 2016.
- INCA. **ESTIMATIVA 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- INCA. **Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].
- INGRAFFEA, A. Melanoma. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p. 33–42, 2013.

- ISLAM, A. et al. Cytotoxicity and apoptotic activity of novel organobismuth(V) and organoantimony(V) complexes in different cancer cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 109, p. 254–267, 2016.
- IVANOV, V. N.; HEI, T. K. Regulation of viability, differentiation and death of human melanoma cells carrying neural stem cells biomarkers: a possibility for neural trans-differentiation. **Apoptosis**, v. 20, n. 7, p. 996–1015, 2015.
- IVES, N. J. et al. Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: A meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 34, p. 5426–5434, 2007.
- IYENGAR, B.; SINGH, A. V. Patterns of neural differentiation in melanomas. **Journal of Biomedical Science**, v. 17, n. 1, p. 87, 2010.
- IZRAELY, S. et al. The Metastatic Microenvironment: Melanoma-Microglia Cross-Talk Promotes the Malignant Phenotype of Melanoma Cells. **International Journal of Cancer**, 2018.
- JAIMES, N.; MARGHOUB, A. A. The Morphologic Universe of Melanoma. **Dermatologic Clinics**, v. 31, n. 4, p. 599–613, 2013.
- JANDIAL, R. Curing brain metastases. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 34, n. 6–7, p. 363–364, 2017.
- JANOČKOVÁ, J. et al. Inhibition of DNA topoisomerases I and II and growth inhibition of HL-60 cells by novel acridine-based compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, n. May, p. 192–202, 2015.
- JANSSEN, L. M. E. et al. The immune system in cancer metastasis: Friend or foe? **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2017.
- JIA, W. et al. Junctional Adhesion Molecules in Cerebral Endothelial Tight Junction and Brain Metastasis. **Anticancer Research**, v. 2360, p. 2353–2359, 2013.
- JONES, M. et al. Antitumour and antimalarial activity of artemisinin-acridine hybrids. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 7, p. 2033–2037, 2009.
- JOYCE, J. A.; POLLARD, J. W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Review Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–252, 2009.
- JUNTILA, M. R.; DE SAUVAGE, F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 346–354, 2013.
- KABIR, Y. et al. DNA repair enzymes: an important role in skin cancer prevention and reversal of photodamage - a review of the literature. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 14, n. 3, p. 297–303, 2015.
- KAMENISCH, Y. et al. UVA-Irradiation Induces Melanoma Invasion via the Enhanced Warburg Effect. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 9, p. 1866–1875, 2016.
- KANAVY HE; GERSTENBLITH MR. Ultraviolet Radiation and Melanoma. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 30, n. 4, p. 222–228, 2011.
- KARRAN, P.; BREM, R. Protein oxidation, UVA and human DNA repair. **DNA repair**, v. 44, p. 178–85, 2016.

- KATT, M. E. et al. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, n. February, 2016.
- KHAKH, B. S.; SOFRONIEW, M. V. Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 942–952, 2015.
- KIBBI, N.; KLUGER, H. The Treatment of Melanoma Brain Metastases. **Current Oncology Reports**, v. 18, n. 12, 2016.
- KIM, J. E. et al. Heterogeneity of expression of epithelial-mesenchymal transition markers in melanocytes and melanoma cell lines. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. MAY, p. 1–8, 2013.
- KIRCHER, D. A. et al. Melanoma Brain Metastasis: Mechanisms, Models, and Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1468, 2016.
- KLEIN, A. et al. Astrocytes facilitate melanoma brain metastasis via secretion of IL-23. **Journal of Pathology**, v. 236, n. 1, p. 116–127, 2015.
- KLEIN, C. A. The Metastasis Cascade. **Science**, v. 321, 2008.
- KOEBERLE, D. et al. Local Tumor Treatment in Combination with Systemic Ipilimumab Immunotherapy Prolongs Overall Survival in Patients with Advanced Malignant Melanoma. **Cancer Immunology Research**, v. 4, n. 9, p. 744–754, 2016.
- KUPHAL, S.; BOSSERHOFF, A. K. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. **Oncogene**, v. 25, n. 2, p. 248–259, 2006.
- KUPHAL, S.; BOSSERHOFF, A. K. E-cadherin cell-cell communication in melanogenesis and during development of malignant melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 524, n. 1, p. 43–47, 2012.
- KUZU, O. F. et al. Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research. **Cancer Growth and Metastasis**, v. 8, n. S1, p. 81–94, 2015.
- LAFAYETTE, E. A. et al. Synthesis, DNA binding and topoisomerase I inhibition activity of thiazacridine and imidazacridine derivatives. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15035–15050, 2013.
- LANGLEY, R. R.; FIDLER, I. J. The biology of brain metastasis. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 180–189, 2013.
- LEE, J. J.; MURPHY, G. F.; LIAN, C. G. Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 94, n. 8, p. 822–38, 2014.
- LEGHA, S. S. et al. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing. **Annals of Oncology**, v. 7, n. 8, p. 827–835, 1996.
- LEVY, C.; KHALED, M.; FISHER, D. E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 9, p. 406–414, 2006.
- LIM, P. K. et al. Gap junction-mediated import of microRNA from bone marrow stromal cells can elicit cell cycle quiescence in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 71, n. 5, p. 1550–1560, 2011.

- LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843–850, 2007.
- LIU, X. et al. An artificial miRNA against HPSE suppresses melanoma invasion properties, correlating with a down-regulation of chemokines and MAPK phosphorylation. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.
- LUCAS, T. et al. Differential expression levels of Par-4 in melanoma. **Melanoma Research**, v. 11, n. 4, p. 379–383, 2001.
- LUKE, J. J.; SCHWARTZ, G. K. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 290–297, 2013.
- MACHIELA, M. J.; CHANOCK, S. J. The Ageing Genome, Clonal Mosaicism and Chronic Disease. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 42, p. 8–13, 2017.
- MARCHETTI, D.; LI, J.; SHEN, R. Astrocytes contribute to the metastatic brain specificity of melanoma cells by producing heparanase. **Cancer Research**, v. 60, p. 4767–4770, 2000.
- MARTINS, C. G. DE B. **Avaliação do mecanismo de ação anticâncer de um novo derivado imidazacridínico (AC05) frente a linhagem de melanoma UACC62.** [s.l: s.n.].
- MCEVILLY, R. J. et al. Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. **Science**, v. 295, n. 5559, p. 1528–1532, 2002.
- MICHALOGLOU, C. et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. **Nature**, v. 436, n. August, p. 720–724, 2005.
- MIDDLETON, M. et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 1, p. 158–166, 2000.
- MILAGRE, C. et al. A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. **Cancer research**, v. 70, n. 13, p. 5549–5557, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia** Secretaria de Atenção à Saúde. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://old.cremerj.org.br/publicacoes/148.PDF>>.
- MOREIRAS, H. et al. Melanin processing by keratinocytes: a non-microbial type of host-pathogen interaction? **Traffic**, 2019.
- MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. **Development (Cambridge, England)**, v. 142, n. 4, p. 620–32, 2015.
- MURRY, B. P. et al. Heparanase brain: Mechanisms of melanoma metastasis to the development and use of a brain slice model. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, p. 217–225, 2006.
- NAJEM, A. et al. P53 and MITF/Bcl-2 identified as key pathways in the acquired resistance of NRAS-mutant melanoma to MEK inhibition. **European Journal of Cancer**, v. 83, p. 154–165, 2017.
- NAYAK, L.; LEE, E. Q.; WEN, P. Y. Epidemiology of brain metastases. **Current Oncology Reports**, v. 14, n. 1, p. 48–54, 2012.
- NEVES, J. K. D. A. L. et al. Biological and immunological activity of new imidazolidines

against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 3, p. 531–538, 2010.

NI, W.; CHEN, W.; LU, Y. Emerging findings into molecular mechanism of brain metastasis. **Cancer Medicine**, n. May, p. 1–14, 2018.

NISHIMURA, E. K. et al. Regulation of E- and P-cadherin expression correlated with melanocyte migration and diversification. **Developmental biology**, v. 215, n. 2, p. 155–66, 1999.

O'CONNELL, M. P.; WEERARATNA, A. T. Change is in the air: The hypoxic induction of phenotype switching in melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 10, p. 2316–2317, 2013.

O'DAY, S. J.; HAMID, O.; URBA, W. J. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): A novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. **Cancer**, v. 110, n. 12, p. 2614–2627, 2007.

OBERHEIM, N. A.; GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. **Methods in Molecular Biology**, v. 814, p. 23–45, 2012.

PALMIERI, D. et al. The biology of metastasis to a sanctuary site. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 1656–62, 15 mar. 2007.

PATTISON, D. I.; RAHMANTO, A. S.; DAVIES, M. J. Photo-oxidation of proteins. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 38–53, 2012.

PEARLMAN, R. L. et al. Potential therapeutic targets of epithelial to mesenchymal transition in melanoma. **Cancer Letters**, v. 391, p. 125–140, 2017.

PEREIRA, M. C. et al. Prostate apoptosis response-4 is involved in the apoptosis response to docetaxel in MCF-7 breast cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 2, p. 531–538, 2013.

PÉREZ-GUIJARRO, E. et al. Genetically engineered mouse models of melanoma. **Cancer**, v. 123, n. Suppl 11, p. 2089–2103, 2017.

PEREZ, D. G. et al. Phase II Trial of carboplatin, weekly paclitaxel and biweekly bevacizumab in patients with unresectable stage IV melanoma - a north central cancer treatment group (NCCTG) Study, N047A. **Cancer**, v. 115, n. 1, p. 119–127, 2009.

PERSON, F. et al. Prevalence of β III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. **Tumor Biology**, v. 39, n. 10, p. 1–11, 2017.

PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. et al. Dormancy of growth-stunted malignant melanoma. The sustainable and smoldering patterns. **Oncology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 54–59, 2014.

PIÉRARD, G. E. et al. Smouldering malignant melanoma and metastatic dormancy: An update and review. **Dermatology Research and Practice**, v. 2012, p. 7–11, 2012.

PIERRAT, M. J. et al. Expression of microphthalmia-associated transcription factor (MITF), which is critical for melanoma progression, is inhibited by both transcription factor GLI2 and transforming growth factor- β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 17996–18004, 2012.

PINNER, S. et al. Intravital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination. **Cancer Research**, v. 69, n. 20,

p. 7969–7977, 2009.

PLOPER, D.; ROBERTIS, E. M. DE. The MITF family of transcription factors : Role in endolysosomal biogenesis , Wnt signaling , and oncogenesis. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 36–43, 2015.

RAGER, E. L.; BRIDGEFORD, E. P.; OLLILA, D. W. Cutaneous melanoma: Update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. **American Family Physician**, v. 72, n. 2, p. 269–276, 2005.

RAMADAN, M. A. et al. Expression of P53, BAX, and BCL-2 in human malignant melanoma and squamous cell carcinoma cells after tea tree oil treatment in vitro. **Cytotechnology**, v. 71, n. 1, p. 461–473, 2019.

RAMAKRISHNA, R.; ROSTOMILY, R. Seed, soil, and beyond: The basic biology of brain metastasis. **Surgical neurology international**, v. 4, p. S256-64, 2013.

RAPOSO, G.; MARKS, M. S. Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 786–797, 2007.

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, n. July, p. 1–11, 2016.

RIBATTI, D. Epithelial-mesenchymal transition in morphogenesis, cancer progression and angiogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 353, n. 1, p. 1–5, 2017.

RIBATTI, D.; MANGIALARDI, G.; VACCA, A. Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, n. 4, p. 145–149, 2006.

RICHMOND, A.; SU, Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. **Disease Models and Mechanisms**, v. 1, n. 2–3, p. 78–82, 2008.

ROBERT, C. et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 26, p. 2517–2526, 2011.

ROBERT, C.; GHIRINGHELLI, F. What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? **The oncologist**, v. 14, n. 8, p. 848–861, 2009.

ROH, M. R. et al. Genetics of Melanocytic Nevi. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 28, n. 6, p. 661–672, 2015.

ROJAS, A. M. et al. The Ras protein superfamily: Evolutionary tree and role of conserved amino acids. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 2, p. 189–201, 2012.

SACZEWSKI, J.; HUDSON, A. L.; RYBCZYNSKA, A. 2-[(Arylmethoxy)Imino]imidazolidines With Potential Biological Activities. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 66, n. 6, p. 671–680, 2009.

SAFAEE ARDEKANI, G. et al. The Prognostic Value of BRAF Mutation in Colorectal Cancer and Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

SALEH, J. Murine models of melanoma. **Pathology Research and Practice**, v. 214, n. 9, p. 1235–1238, 2018.

- SANMAMED, M. F. et al. Defining the optimal murine models to investigate immune checkpoint blockers and their combination with other immunotherapies. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 7, p. 1190–1198, 2016.
- SANTOS, R. V. C. et al. Potential Therapeutic Agents Against Par-4 Target for Cancer Treatment: Where Are We Going? **Current Drug Targets**, v. 20, 2019.
- SASVARI, Z. et al. Inhibition of RNA Recruitment and Replication of an RNA Virus by Acridine Derivatives with Known Anti-Prion Activities. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.
- SCENEAY, J.; SMYTH, M. J.; MÖLLER, A. The pre-metastatic niche: finding common ground. **Cancer metastasis reviews**, v. 32, n. 3–4, p. 449–64, dez. 2013.
- SCHATTON, T. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1102, p. 287–324, 2013.
- SCHOLZEN T; J, G. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 322, n. August 1999, p. 311–322, 2000.
- SEBERG, H. E. et al. Beyond MITF: Multiple transcription factors directly regulate the cellular phenotype in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 30, n. 5, p. 454–466, 2017.
- SEOANE, J.; DE MATTOS-ARRUDA, L. Brain metastasis: New opportunities to tackle therapeutic resistance. **Molecular Oncology**, v. 8, n. 6, p. 1120–1131, 2014.
- SERASINGHE, M. N. et al. Anti-apoptotic BCL-2 proteins govern cellular outcome following B-RAFV600E inhibition and can be targeted to reduce resistance. **Oncogene**, v. 34, n. 7, p. 857–867, 2015.
- SEYFRIED, T. N.; HUYSENTRUYT, L. C. On the Origin of Cancer Metastasis. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 18, n. 1–2, p. 43–73, 2013.
- SHAIN, A. H. et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 20, p. 1926–1936, 2015.
- SHARMA, V.; KHAN, M. S. Y. Synthesis of novel tetrahydroimidazole derivatives and studies for their biological properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 7–8, p. 651–658, 2001.
- SHIMIZU, A. et al. Decreased expression of class III β -tubulin is associated with unfavourable prognosis in patients with malignant melanoma. **Melanoma Research**, v. 26, n. 1, p. 29–34, 2016.
- SIMMONS, J. L. et al. MITF and BRN2 contribute to metastatic growth after dissemination of melanoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- SIRET, C. et al. Interplay between cadherins and $\alpha 2\beta 1$ integrin differentially regulates melanoma cell invasion. **British Journal of Cancer**, n. August, p. 1–9, 2015.
- SLEEMAN, J. P. The metastatic niche and stromal progression. **Cancer metastasis reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 429–40, dez. 2012.
- SMITH, M. P. et al. A PAX3/BRN2 rheostat controls the dynamics of BRAF mediated MITF regulation in MITF high/AXL low melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 2018.
- SOMMER, L. Generation of melanocytes from neural crest cells. **Pigment Cell and**

Melanoma Research, v. 24, n. 3, p. 411–421, 2011.

SONDHI, S. M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 555–563, 2010.

SPAGNOLO, F. et al. BRAF-mutant melanoma: Treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. **OncoTargets and Therapy**, v. 8, p. 157–168, 2015.

STAMATOVIC, S. M.; KEEP, R. F.; ANDJELKOVIC, A. V. Brain endothelial cell-cell junctions: How to “open” the blood brain barrier. **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 3, p. 179–192, 2008.

STELZER, K. J. Epidemiology and prognosis of brain metastases. **Surgical neurology international**, v. 4, n. Suppl 4, p. S192-202, jan. 2013.

STEPHEN, P. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **The Lancet**, v. 133, n. 3421, p. 571–573, 1889.

STEWART, B. W.; WILD, C. **WORLD CANCER REPORT 2014**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.

STRUB, T. et al. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. **Oncogene**, v. 30, n. 20, p. 2319–2332, 2011.

SUN, X.; KAUFMAN, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma**, v. 127, n. 2, p. 175–186, 2018.

TAFT, J. R.; VERTES, R. P.; PERRY, G. W. Distribution of GFAP+ astrocytes in adult and neonatal rat brain. **International Journal of Neuroscience**, v. 115, n. 9, p. 1333–1343, 2005.

TAKEDA, K. et al. IFN- γ production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 4, p. 777–785, 2011.

TAUBENBERGER, A. V. In vitro microenvironments to study breast cancer bone colonisation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 79, p. 135–144, 2014.

THURBER, A. E. et al. Inverse expression states of the BRN2 and MITF transcription factors in melanoma spheres and tumour xenografts regulate the NOTCH pathway. **Oncogene**, v. 30, n. 27, p. 3036–3048, 2011.

TOMEI, S. et al. The immune-related role of BRAF in melanoma. **Molecular oncology**, v. 9, n. 1, p. 93–104, 2015.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. **N Eng J Med**, v. 366, n. 26, p. 2443–2454, 2012.

TU, H. et al. Cancer risk associated with chronic diseases and disease markers: prospective cohort study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 360, p. k134, 2018.

TUCCI, M. et al. Exosomes in melanoma : a role in tumor progression , metastasis and impaired immune system activity. v. 9, n. 29, p. 20826–20837, 2018.

TUDREJ, K. B.; CZEPIELEWSKA, E.; KOZŁOWSKA-WOJCIECHOWSKA, M. State of the art paper SOX10-MITF pathway activity in melanoma cells. **Archives of Medical Research**, v. 13, n. 6, p. 1493–1503, 2017.

- VACHTENHEIM, J.; ONDRUSOVÁ, L. Microphthalmia-associated transcription factor expression levels in melanoma cells contribute to cell invasion and proliferation. **Experimental Dermatology**, v. 24, n. 7, p. 481–484, 2015.
- VALIENTE, M. et al. Serpins Promote Cancer Cell Survival and vascular Cooption on Brain Metastasis. **Cell**, v. 156, n. 5, p. 1002–1016, 2014.
- VAN KILSDONK, J. W. J. et al. Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model. **Melanoma Research**, v. 20, n. 5, p. 372–380, 2010.
- VENUR, A. V.; AHLUWALIA, M. S. Prognostic scores for brain metastasis patients : use in clinical practice and trial design. **Chinese Clinical Oncology**, v. 4, n. 2, p. 1–7, 2015.
- VLČKOVÁ, K. et al. Inducibly decreased MITF levels do not affect proliferation and phenotype switching but reduce differentiation of melanoma cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 4, p. 2240–2251, 2018.
- VLODAVSKY, I. . et al. Mammalian heparanase: Involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. **Seminars in cancer biology**, v. 12, p. 121–129, 2002.
- WALENSKY, L. D. Cheating Death: New Molecules Block BAX. **Trends in Molecular Medicine**, v. xx, p. 3–5, 2019.
- WANG, D. D.; BORDEY, A. The Astrocyte Odyssey. **Progress in Neurobiology**, v. 86, n. 4, p. 342–367, 2008.
- WANG, J. X.; FUKUNAGA-KALABIS, M.; HERLYN, M. Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 3, p. 191–196, 2016.
- WELLBROCK, C. et al. Oncogenic BRAF Regulates Melanoma Proliferation through the Lineage Specific Factor MITF. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, p. 1–10, 2008.
- WELLBROCK, C.; AROZARENA, I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 28, n. 4, p. 390–406, 2015a.
- WELLBROCK, C.; AROZARENA, I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 28, n. 4, p. 390–406, 2015b.
- WESTPHAL, D.; OLIVA, I. C. G.; NIESSNER, H. Molecular Insights into Melanoma Brain Metastases. **Cancer**, v. 123, p. 2163–2175, 2017.
- WILSON, M. A.; SCHUCHTER, L. M. Chemotherapy for Melanoma. **Cancer Treatment and Research**, v. 167, p. 209–229, 2016.
- WOLBURG, H.; LIPPOLDT, A. Tight junctions of the blood – brain barrier: Development, composition and regulation. **Vascular Pharmacology**, v. 38, p. 323–337, 2002.
- WOLCHOK, J. D. et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 2, p. 122–33, 2013.
- WROBEL, J. K.; TOBOREK, M. Blood-brain barrier remodeling during brain metastasis formation. **Molecular Medicine**, v. 1, n. 305, p. 1–36, 2016.
- XU, X.; FARACH-CARSON, M. C.; JIA, X. Three-Dimensional In Vitro Tumor Models for

Cancer research and Drug Evaluation. **Biotechnol Adv.**, v. 32, n. 7, p. 1256–1268, 2015.

YEUNG, K. T.; YANG, J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. **Molecular oncology**, v. 11, n. 1, p. 28–39, 2017.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 47–59, 2008.

YOUNG, K.; MINCHOM, A.; LARKIN, J. BRIM-1, -2 and -3 trials: improved survival with vemurafenib in metastatic melanoma patients with a BRAF(V600E) mutation. **Future Oncol**, v. 8, n. 5, p. 499–507, 2012.

ZAIDI, M. R.; DAY, C. P.; MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2381–2391, 2008.

APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO SOBRE A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPOSTOS INDÓLICOS

Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities.

Elizabeth Almeida Lafayette^a, Sinara Mônica Vitalino de Almeida^{b,c*}, Renata Virginia Cavalcanti Santos^d, Jamerson Ferreira de Oliveira^e, Cezar Augusto da Cruz Amorim^e, Rosali Maria Ferreira da Silva^f, Maira Galdino da Rocha Pitta^d, Ivan da Rocha Pitta^d, Ricardo Olimpio de Moura^e, Luiz Bezerra de Carvalho Júnior^b, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^d, Maria do Carmo Alves de Lima^e.

^a Departamento de Química e Física, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia, PB, Brasil.

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), PE, Brasil.

^c Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns (FACETEG), Universidade de Pernambuco (UPE), Garanhuns, PE, Brasil.

^d Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), PE, Brasil.

^e Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

^f Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCFAR), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

* Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus Campina Grande, PB, Brasil.

Abstract

Molecules bearing indole nucleus present diverse biological properties such as antitumor and anti-inflammatory activities that can be associated both to DNA and protein interactions. This study aimed to the synthesis of new indole derivatives with thiazolidines and imidazolidine rings condensed as side chains besides the evaluation of their ability to interact with the DNA and antitumor and topoisomerase inhibition activities. All derivatives were successfully synthesized and their structures were elucidated by mass spectrometry (MS), infrared (IR), spectroscopy ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY ¹H-¹H and HSQC ¹H-¹³C. The antitumor activity was evaluated against different cancer cell lines using the antiproliferative MTT assay. The ability of DNA binding was analyzed by absorption spectroscopy and fluorescence technique using ethidium bromide (EB) as a fluorescent probe. Changes were observed in spectroscopic properties of the compounds after interacting with ctDNA (calf thymus DNA), with hypochromic and hyperchromic effects, besides blue or red shifts in the maxima of spectra. The indole derivative 5-(1*H*-Indol-3-ylmethylene)-thiazolidin-2,4-dione (4c) was the best in antitumor assay against the breast line tested (T47D), with IC₅₀ value lower than the positive control, doxorubicin (1.93 and 4.61 μM, respectively). On the other hand, the compound 3-amino-5-(1*H*-indol-3-ylmethylene)-2-thioxo-thiazolidin-4-one (4a) was active against leukemia cell lines (HL60 and K562) with the high value of the DNA binding constant, K_b of 5.69 x 10⁴. However, this compound (4a) did not inhibit the topoisomerase I activity evaluated by relaxation assay. These results show that the indole nucleus contribute to the incorporation of molecules into the DNA. Moreover, it was highlighted that basic side chains, such as thiazolidines and imidazolidines, and free amino group, are relevant for design of promising antitumor and DNA binding compounds.

APÊNDICE B – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO SOBRE O PAPEL DAS MODIFICAÇÕES GLICOBOLÓGICAS NO CONTEXTO DA HIPÓXIA

Cellular Physiology
and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2017;41:1801-1829

DOI: 10.1159/000471912
Published online: April 03, 2017

Accepted: January 17, 2017

© 2017 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel
www.karger.com/cpb

Karger
Open access

1801

This article is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International license (CC BY-NC-ND) (<http://www.karger.com/Services/OpenAccessLicense>). Usage and distribution for commercial purposes as well as any distribution of modified material requires written permission.

Review

Glycobiology Modifications in Intratumoral Hypoxia: The Breathless Side of Glycans Interaction

Antônio F. Silva-filho^a Wanessa L.B. Sena^a Luiza R.A. Lima^{ab} Lidiane V.N. Carvalho^a
Michelly C. Pereira^{ac} Lucas G.S. Santos^a Renata V.C. Santos^a Lucas B. Tavares^a
Maira G.R. Pitta^{ad} Moacyr J.B.M. Rêgo^{ad}

^aLaboratory of Immunomodulation and New Therapeutic Approaches (LINAT), Center for Research on Therapeutic Innovation - Suely Galdino (NUPIT-SG-UFPE), Recife, ^bFaculdades Integradas de Patos, Patos, PB, ^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, ^dDepartment of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

Key Words

Glycobiology • Glycosyltransferases • Hypoxic microenvironment • Cancer • Biomarker • Carbohydrate metabolism

Abstract

Post-translational and co-translational enzymatic addition of glycans (glycosylation) to proteins, lipids, and other carbohydrates, is a powerful regulator of the molecular machinery involved in cell cycle, adhesion, invasion, and signal transduction, and is usually seen in both *in vivo* and *in vitro* cancer models. Glycosyltransferases can alter the glycosylation pattern of normal cells, subsequently leading to the establishment and progression of several diseases, including cancer. Furthermore, a growing amount of research has shown that different oxygen tensions, mainly hypoxia, leads to a markedly altered glycosylation, resulting in altered glycan-receptor interactions. Alteration of intracellular glucose metabolism, from aerobic cellular respiration to anaerobic glycolysis, inhibition of integrin $\alpha_1\beta$ translocation to the plasma membrane, decreased 1,2-fucosylation of cell-surface glycans, and galectin overexpression are some consequences of the hypoxic tumor microenvironment. Additionally, increased expression of gangliosides carrying N-glycolyl sialic acid can also be significantly affected by hypoxia. For all these reasons, it is possible to realize that hypoxia strongly alters glycobiochemical events within tumors, leading to changes in their behavior. This review aims to analyze the complexity and importance of glycoconjugates and their molecular interaction network in the hypoxic context of many solid tumors.

© 2017 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel

APÊNDICE C – ARTIGO DE REVISÃO PUBLICADO SOBRE O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO PAR-4 NO TRATAMENTO TUMORAL

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Drug Targets, 2019, 20, 000-000

1

REVIEW ARTICLE

Potential Therapeutic Agents Against Par-4 Target for Cancer Treatment: Where Are We Going?

Renata Virgínia Cavalcanti Santos^{1,#}, Wanessa Layssa Batista de Sena^{1,#}, Flaviana Alves dos Santos¹, Antônio Felix da Silva Filho¹, Marina Galdino da Rocha Pitta², Maira Galdino da Rocha Pitta¹, Moacyr Barreto de Melo Rego¹ and Michelly Cristiny Pereira^{1,*}

¹Laboratory of Immunomodulation and New Therapeutical Approaches, Research Centre for Therapeutic Innovation Suely Galdino (NUPIT-SG), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ²Laboratory of Planning and Synthesis of Drugs, NUPIT-SG, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: August 07, 2018
Revised: November 15, 2018
Accepted: November 19, 2018

DOI:
10.2174/1389450120666181126122440

Abstract: One of the greatest challenges of cancer therapeutics nowadays is to find selective targets successfully. Prostate apoptosis response-4 (Par-4) is a selective tumor suppressor protein with an interesting therapeutic potential due to its specificity on inducing apoptosis in cancer cells. Par-4 activity and levels can be downregulated in several tumors and cancer cell types, indicating poor prognosis and treatment resistance. Efforts to increase Par-4 expression levels have been studied, including its use as a therapeutic protein by transfection with adenoviral vectors or plasmids. However, gene therapy is very complex and still presents many hurdles to be overcome. We decided to review molecules and drugs with the capacity to upregulate Par-4 and, thereby, be an alternative to reach this druggable target. In addition, Par-4 localization and function are reviewed in some cancers, clarifying how it can be used as a therapeutic target.

Keywords: Prostate apoptosis response-4, therapeutic innovation, tumor suppressor protein.

APÊNDICE D – CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

Livro: Inovação Tecnológica em Fármacos e Medicamentos, 2017.

ISBN: 978-85-5707-492-7.

CAPÍTULO X**ABORDAGENS IMUNOBIOLOGICAS NO
TRATAMENTO E PREVENÇÃO DO CÂNCER**

Gabriela Souto Vieira de Mello¹

Marina Ferraz Cordeiro²

Renata Virgínia Cavalcanti Santos²

Michelly Cristiny Pereira²

Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo²

¹UniNovartis/ UFPE, Universidade Federal de Pernambuco.

²Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica (NUPIT/UFPE).

E-mail de contato: gabrielavmello@hotmail.com

RESUMO - *O câncer é caracterizado por mais de 100 tipos de doenças, e a evolução do conhecimento científico permitiu um maior esclarecimento sobre as vias carcinogênicas, ampliando conceitos antes baseados apenas na hiperproliferação celular, para conceitos mais complexos como a interação das células tumorais e o sistema imune. Esse novo olhar permitiu o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas através da estimulação da*

**ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DOS ANIMAIS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 27 de outubro de 2015.

Ofício nº 107/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo**

Núcleo de Pesquisa para Inovação Terapêutica Suely Galdino – CCB

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.012500/2015-09

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Estabelecimento de um modelo *in vitro* para o estudo do microambiente do nicho pré-metastático e metástase cerebrais como ferramentas para a inovação terapêutica”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

<p>Animais: ratos heterogênicos Wistar; Idade: progenitores adultos e seus neonatos de 0 a 3 dias; Peso: 250-300g (adultos) e 7g (neonatos); Sexo: 40 machos e 120 fêmeas; Nº total de animais: 310 animais (160 progenitores e 150 neonatos).</p>
--

Atenciosamente,

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ NO USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vitro* e *in vivo* DE INÉDITAS TIOSSEMICARBAZONAS, TIAZOLINONAS E TIAZOLIDINADIONAS" protocolo nº 168/15 sob a responsabilidade de Roger Chammas e Renata Virgínia Cavalcanti Santos, apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.099, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 02.12.15

Vigência do Projeto	Março/2016
Espécie/linhagem	Camundongo Balb/c
Nº de animais	64
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	fêmeas
Origem	Biotério/FMUSP

CEUA-FMUSP, 02 de Dezembro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais