

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**Avaliação do potencial citotóxico da biflorina em células de
melanoma humano com diferentes padrões genéticos**

ANA CAROLINA LIMA RALPH

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ANA CAROLINA LIMA RALPH

**Avaliação do potencial citotóxico da biflorina em células de
melanoma humano com diferentes padrões genéticos**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para
obtenção de título de mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marne Carvalho de Vasconcellos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Danielle Queiroz Calcagno

MANAUS

2014

Ana Carolina Lima Ralph

Avaliação do potencial citotóxico da biflorina em células de
melanoma humano com diferentes padrões genéticos

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção de título de Mestre

Prof^a. Dr^a. Marne Carvalho de Vasconcellos
Orientadora/Presidente

Prof^a. Dr^a. Vanessa Moraes Freitas

Prof. Dr. Pritesh Jaychand Lalwani

Manaus, 28 de Março de 2014.

In memoriam à minha avó Albertina por me fazer o que eu sou hoje.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar os meus caminhos;

Aos meus pais, em especial, à minha mãe Alriza de Queiroz Lima por me apoiar e amar incondicionalmente;

Ao meu namorado, William Castro da Cruz, pelo companheirismo e paciência;

Aos meus tios, Alberto, Augusto, Arlindo, Alcides, Anísio e Alice Lima pelos conselhos;

À minha madrinha Euzami e minha irmã Andreza pelo carinho;

À Prof^a. Dr^a. Marne Carvalho de Vasconcellos, pela oportunidade de grande desenvolvimento profissional;

À prof^a. Dr^a Daniele Queiroz Calcagno, pela amizade e ótimas dicas;

Aos meus companheiros de laboratório: Elenn Aranha, Rafaela Silva, Zalina Rodrigues, Gilderlany Gomes, Josélia Cavalcante, Lucileno Lima, Rodrigo Souza, Fernanda Gomes, Tatiana Pedrosa, Zanair Vasconcelos e Gleyce dos Santos Barbosa, pelo crescimento juntos;

Aos Laboratórios de Atividade Biológica e de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, especialmente o prof^o. Dr. Emerson Silva Lima e o prof^o. Dr. José Pereira Neto, pela disponibilidade de esclarecer dúvidas e disponibilizar equipamentos e reagentes;

Ao Laboratório de Disciplina Genética – Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, em nome da prof^a Dr^a Marília Arruda de Cardoso Smith por me receber e viabilizar a metodologia RT-PCR;

Ao Laboratório de Patologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Farmácia - Universidade de São Paulo, em nome da prof^a Dr^a. Silvyta Stuch Maria-Engler por disponibilizar as linhagens celulares, centro desse estudo;

Aos meus amigos, Valéria Pacheco, Juliana Marinho, Artemis Michiles, Brunna Tavares, Suely Chagas, Thaira Alves, Anne Cristine Almeida, Carolina Pacheco e Bárbara Seabra por tornarem os meus dias mais alegres;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas por toda a infraestrutura disponibilizada;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo auxílio de passagens e ajuda de custo em viagens para treinamentos e congressos;

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

RESUMO

O câncer é um problema de saúde pública e a segunda causa de morte no mundo. Dentre os variados tipos de neoplasias, o melanoma cutâneo destaca-se por sua crescente incidência, alta agressividade e baixa sobrevida. Como alternativa terapêutica tem se investigado as vias de sinalização e mecanismos moleculares de genes e proteínas alvo-específicas do melanoma. Levando-se em consideração a atividade antitumoral da biflorina, substância isolada das raízes da *Capraria biflora*, que já possui comprovada atividade citotóxica *in vitro* em diversas linhagens tumorais e *in vivo* em modelo de carcinoma de Erlich e sarcoma 180. O presente trabalho objetivou mostrar a atividade da biflorina frente três diferentes linhagens de melanoma humano - SK-Mel 19, 28 e 103. O modelo de estudo com as três linhagens celulares proporcionou a comparação do efeito da biflorina em diferentes mutações comuns em melanomas humanos quanto à sua capacidade citotóxica, mecanismo de morte celular, capacidade genotóxica e alteração na expressão dos genes *BRAF*, *MELK*, *TYMS*, *RAD*, *MGMT*, *DNMT1*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4*, *MeCP2*. A biflorina, assim como os agentes quimioterápicos doxorrubicina e dacarbazina (controles positivos), inibiu a proliferação celular das três linhagens de melanoma humano estudados, sendo mais citotóxica contra SK-Mel 103, seguida pela SK-Mel 19, e menos citotóxica à SK-Mel 28. A média da CI_{50} da biflorina em todos os tempos e linhagens testados foi de $3,23 \pm 0,83 \mu M$, variando de $1,54 \mu M$ a $9,2 \mu M$ pelo método alamar blue. Avaliando a citotoxicidade pelo teste de exclusão por azul de tripan, a biflorina causou diminuição de células viáveis com consequente aumento de células não-viáveis de forma concentração e tempo dependentes. Através da coloração cristal violeta das células tratadas com biflorina, observaram-se alterações morfológicas de citólise com aumento de restos celulares dispersos, vacuolização do citoplasma, desarranjo da cromatina com áreas claras ou espaço nuclear vazio. Adicionalmente, na coloração diferencial LA/BE, foi observado um aumento no número de células apoptóticas de forma concentração dependente, entretanto, o número de células em necrose não variou. No teste do cometa evidenciou-se a produção de quebras de fita simples e dupla de DNA pela biflorina nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM . Já no teste do cometa modificado observou-se inibição da metilação em todas as concentrações testadas nas SK-Mel 19 e 28, o mesmo não ocorreu na SK-Mel 103. A biflorina também se mostrou capaz de diminuir a expressão de genes da metilação *DNMT1*, *DNMT3A*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4*, *MeCP2*, de progressão do ciclo celular *MELK*, replicação do DNA *TYMS* e reparo do DNA *RAD* e *MGMT*. Os resultados aqui apresentados apontam a biflorina como um importante agente citotóxico em linhagem de melanoma humano.

Palavras-chave: melanoma cutâneo, *Capraria biflora*, SK-Mel, citotoxicidade, genotoxicidade, metilação

ABSTRACT

Cancer is a public health problem and the second cause of death worldwide. Among many types of cancer, cutaneous melanoma has a notable increasing incidence, high aggressiveness and poor survival. Alternative therapy has been investigated like signaling pathways and molecular mechanisms of target specific genes and proteins of melanoma. Taking into account the antitumor activity of biflorin, substance isolated from *Capraria biflora* roots, which is cytotoxic *in vitro* in many tumor cell lines and antitumor activity *in vivo* like Erlich and Sarcoma 180. This study aimed to show the activity of biflorin in three different strains of human melanoma - SK-Mel 19, 28 and 103. The study model with three cell lines provided a comparison of the effect of biflorin in different common mutations of human melanomas cell lines. Were evaluated the cytotoxic capacity, cell death mechanism, genotoxic capacity and changes in the expression of *BRAF*, *MELK*, *TYMS*, *RAD*, *MGMT*, *DNMT1*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4*, *MeCP2*. The biflorin, as well as the agents doxorubicin and dacarbazine (positive control), inhibited proliferation of the three human melanoma cell lines studied and was more cytotoxic against SK-Mel 103, followed by SK-Mel 19 and SK-Mel 28. The IC_{50} mean of biflorin at all times and tested strains were $3.23 \pm 0.83 \mu M$, ranging from 1.54 to $9.2 \mu M$. Through crystal violet staining of cells treated with biflorin revealed morphological changes like cytolysis with increased of scattered cellular debris, cytoplasm vacuolization, disruption of chromatin with empty nuclear space. Additionally, in the differential staining LA /BE , we observed an increase in the number of apoptotic cells as there was an increase in the concentration of biflorin, however, the number of necrotic cells did not change. Comet assay revealed a production of single and double strand breaks after treatment with biflorin at concentrations of 2.5 and $5.0 \mu M$. At modified comet assay was observed inhibition of methylation at all concentrations tested at SK-Mel 19 and 28. Biflorin also have shown to decrease the expression of methylation genes *DNMT1*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4* and *MeCP2*, genes of cell cycle progression *MELK*, gene of DNA replication *TYMS*, and DNA repair genes *RAD* and *MGMT*. The results presented here may indicate the biflorin as an important cytotoxic agent.

Keywords: cutaneous melanoma, *Capraria biflora* L., SK-Mel, cytotoxicity, genotoxicity, methylation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da organização geral das respostas ao dano ao DNA. Adaptado de Khanna & Jackson, 2001	19
Figura 2 - Vias de reparo de quebras de fita dupla. HR – reparo homólogo; NHEJ – junção final não-homóloga; RPA – proteína A de replicação; Rad 52 – proteína ligadora do DNA; Rad 51 – proteína formadora de filamento de DNA para invasão da fita. Adaptado de Wu et al., 2008).....	27
Figura 3 - Ativação da p53 após quebras de fita dupla. Adaptado de De Zio et al., 2013.....	30
Figura 4 – Diferentes padrões de metilação, modificação das histonas e estrutura da cromatina entre células normais e tumorais. Mecanismo dos inibidores de DNMT. Adaptado de Ren et al., 2011.	32
Figura 5 – Desenho esquemático do desenvolvimento do melanoma cutâneo, através dos processos de iniciação, promoção e progressão. Adaptado de DEMIERRE; SONDAK, 2005.	37
Figura 6 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes homens e mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação quanto ao melanoma maligno da pele. Adaptado de INCA, 2014.	39
Figura 7 – A. melanoma inicial com proliferação de células hipercromáticas; B. lesão hiperpigmentada de melanoma intermediário com bordas irregulares produzidas por melanócitos coalescentes formando agregados celulares; C. lesão mais tardia com assimetria e variedade de coloração apresentando melanócitos atípicos; D.lesão macular ou papular causado pela invasão da derme papilar por melanócitos atípicos; E. melanoma avançado com lesão apresentando ulceração e crescimento nodular decorrente de proliferação de melanócitos atípicos envolvendo estruturas mais profundas da derme. Adaptado de Cockerell, 2012.	43
Figura 8 - Lesões genéticas no melanoma. Múltiplas vias de sinalização, perda de supressores tumorais e amplificação de proteínas do ciclo celular são características das células do melanoma. A mutação BRAF V600E é um alvo importante para o desenvolvimento de novos medicamentos (caixa vermelha). Adaptado de SHEPHERD et al., 2010.	52
Figura 9 - <i>Capraria biflora</i> . A) folhas e flor; B) raízes. Fonte: Vasconcellos et al., 2007.	59
Figura 10 – Estrutura molecular da biflorina, uma <i>o</i> -naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8- <i>bc</i>]-pran-7,8-diona) prenilada.....	60
Figura 11 – Alterações morfológicas encontradas nas linhagens SK-Mel após 24 horas de tratamento com biflorina. As fotos são representativas de três experimentos independentes. A – células após 24h de exposição ao DMSO representando o controle negativo de A.1 SK-Mel 19, A.2-SK-Mel 28, e A.3 SK-Mel 103, ambas no aumento de 400x apresentando ausência de restos celulares dispersos e aspecto celular íntegro. B – células após tratamento com biflorina, aumento de 200x. B.1 apresenta SK-Mel 19 lisadas após tratamento com biflorina 5,0 µM por 24 horas com perda de citoplasma e aparecimento de restos celulares dispersos. B.2 apresenta SK-Mel 28 após tratamento com biflorina a 5,0 µM por 24 horas com frequente aparecimento de vacúolos no citoplasma. B.3 após tratamento com 2,5 µM da biflorina, seta vermelha mostra célula SK-Mel 103 apresentando núcleo com fragmentação da cromatina.....	88
Figura 12 -Morfologia da SK-Mel 19 após 24 horas de tratamento com biflorina. DMSO é o controle negativo, DOX – Doxorubicina 5µM e DOX-doxorubicina 5µM. As fotos são representativas de três experimentos independentes e foram tiradas no aumento de 400x.	89
Figura 13 -Morfologia da SK-Mel 28 após 24 horas de tratamento com biflorina. DMSO é o controle negativo, DOX – Doxorubicina 5,0 µM e DAC – Dacarbazina a 5,0 µM. As fotos são representativas de três experimentos independentes e foram tiradas no aumento de 400x.....	90
Figura 14 -Morfologia da SK-Mel 103 após 24 horas de tratamento com biflorina. DMSO é o controle negativo, DOX – Doxorubicina 5,0 µM e DAC - Dacarbazina a 5,0 µM. As fotos são representativas de três experimentos independentes e foram tiradas no aumento de 400x.....	91
Figura 15 - Imagens de células da linhagem SK-Mel 19 coradas com LA/BE tratadas com biflorina durante 24h. (a) células viáveis em verde (seta verde); (b) células apoptóticas apresentando núcleo laranja/vermelho e citoplasma verde em “blebbing” (seta vermelha); (c) células necróticas com núcleo e citoplasma vermelhos (seta azul).....	92

Figura 16 Análise de fragmentação do DNA às células SK-Mel 28 após: A – contato com DMSO 0,1% (controle negativo); B - Dacarbazina 5,0 μ M; C - Doxorrubicina 5,0 μ M; D- biflorina 1,0 μ M; E – biflorina 2,5 μ M; e F - biflorina 5,0 μ M..... 100

LISTA DE QUADROS E TABELA

Quadro 1 – Formas clínicas do melanoma cutâneo	40
Quadro 2 – Categorias de estadiamento TNM do Melanoma Cutâneo. Adaptado de Balch et al, 2009.	41
Quadro 3 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização MAPKK-RAS/RAF/MEK/ERK e RAS/PI3K/PTEN/AKT no melanoma cutâneo	46
Quadro 4 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização CDKN2A no melanoma cutâneo.....	47
Quadro 5 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização de apoptose no melanoma cutâneo..	47
Quadro 6 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização do ciclo celular no melanoma cutâneo. Adaptado de Fisher et al., 2014.....	48
Quadro 7 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização da melanogênese no melanoma cutâneo. Adaptado de Fisher et al., 2014	48
Quadro 8 – Genes e proteínas envolvidas nas vias de sinalização da telomerase, receptores de superfície, e metástase no melanoma cutâneo. Adaptado de Fisher et al., 2014.....	49
Quadro 9 - Características genéticas das linhagens utilizadas. Wt - wild-type (tipo selvagem); mRNA – RNA mensageiro; prot - proteína; Q61R - mutação no códon 61, presente no éxon 3, ocasionada pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 182, que resulta na substituição de guanina por arginina; p53 R273H: mutação hot spot da proteína, resultando na substituição de arginina por histidina no códon 273; V600E - substituição de valina por ácido glutâmico na posição 599; ND – não detectado. NA – informação não disponível. Fonte: adaptado de M. Santos, 2011.....	65
Quadro 10 - Ensaio com sonda de hidrólise TaqMan® para análise de expressão dos genes selecionados por <i>microarray</i>	75
Tabela 1 – CI ₅₀ da Dacarbazina, Doxorubicina e biflorina nas linhagens SK-Mel 19, 28 e 103 após 24, 48 e 72 horas de tratamento obtidas pelo método Alamar Blue. O resultado representa a média das CI ₅₀ de três experimentos independentes. Utilizou-se regressão não linear para obtenção das CI50 considerando intervalo de confiança de 95%.....	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Inibição do crescimento celular da SK-Mel 19 em (a) 24 horas, (b) 48 horas e (c) 72 horas de tratamento com biflorina, DAC-dacarbazina 5µM e DOX-doxorrubicina 5µM. Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$, comparando com o controle negativo.	79
Gráfico 2 - Inibição do crescimento celular da SK-Mel 28 em (a) 24 horas, (b) 48 horas e (c) 72 horas de tratamento com biflorina, DAC-dacarbazina 5µM e DOX-doxorrubicina 5µM. Os dados apresentam os resultados em triplicata de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$ comparando com o controle negativo. ...	81
Gráfico 3 - Inibição do crescimento celular da SK-Mel 103 em (a) 24 horas, (b) 48 horas e (c) 72 horas de tratamento com biflorina, DAC-dacarbazina 5µM e DOX-doxorrubicina 5µM. Os dados apresentam os resultados em triplicata de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$ comparando com o controle negativo.	82
Gráfico 4 - Inibição da proliferação celular das linhagens SK-Mel 19, SK-Mel 28 e SK-Mel 103 em diferentes tempos de tratamento (24, 48, 72h) com biflorina, DAC-dacarbazina 5µM e DOX-doxorrubicina 5µM. Os dados apresentam os resultados em triplicata de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$, sendo que *comparando com 24 horas de tratamento e # comparando com 48 horas de tratamento.	84
Gráfico 5 -Porcentagem de morte celular em (a) 24 horas de tratamento; (b) 48 horas de tratamento e; (c) 72 horas de tratamento com biflorina, DAC-dacarbazina 5µM e DOX-doxorrubicina 5µM. São apresentadas as médias dos resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni <i>posttests</i> . Consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$ sendo *comparação dos tratamentos com o controle negativo na mesma linhagem; # comparação dos tratamentos das SK-Mel 28 e 103 com a SK-Mel 19 e; ° comparação dos tratamentos entre SK-Mel 28 e 103.	86
Gráfico 6 - Tipo de morte celular induzida pela biflorina, dac-dacarbazina 5µM e dox-doxorrubicina 5µM nas células SK-Mel 19 após tratamento por (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas. São apresentados os resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$ frente ao controle negativo.	94
Gráfico 7 - Tipo de morte celular induzida pela biflorina, dac-dacarbazina 5µM e dox-doxorrubicina 5µM, nas células SK-Mel 28 após tratamento por (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas. São apresentados os resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$ frente ao controle negativo.	95
Gráfico 8 -Tipo de morte celular induzida pela biflorina, dac-dacarbazina 5µM e dox-doxorrubicina 5µM, nas células SK-Mel 103 tratamento de (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas. São apresentados os resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$ frente ao controle negativo.	96
Gráfico 9 – Comparação da porcentagem de apoptose entre as linhagens SK-Mel 19, 28 e 103 após o tratamento de (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas com biflorina, dac-dacarbazina 5µM e dox-doxorrubicina 5µM. São apresentadas as médias dos resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$ sendo *comparação dos tratamentos com o controle negativo na mesma linhagem; # comparação dos tratamentos das SK-Mel 28 com 19, e SK-Mel 103 com a SK-Mel 19 e; ° comparação dos tratamentos entre SK-Mel 28 e 103.	98

Gráfico 10 - Fragmentação do DNA causado pela biflorina, dacarbazina (dac) 5µM e doxorrubicina (dox) 5µM, às células da linhagem SK-Mel 19 . A. índice de dano em cometa alcalino e neutro; B.1 - frequência de dano por cometa alcalino; B.2 - frequência de dano por cometa neutro. Para o índice de dano usou-se ANOVA <i>oneway</i> seguido do teste de Tukey (<i>Multiple Comparison Test</i>). Para a frequência de dano usou-se ANOVA <i>2way</i> seguido de Bonferroni <i>posttest</i> . Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$, ambos em relação ao controle negativo.	101
Gráfico 11 - Fragmentação do DNA causado pela biflorina, dacarbazina (dac) 5µM e doxorrubicina (dox) 5µM, às células da linhagem SK-Mel 28 . A. índice de dano em cometa alcalino e neutro; B.1 - frequência de dano por cometa alcalino; B.2 - frequência de dano por cometa neutro. Para o índice de dano usou-se ANOVA <i>oneway</i> seguido do teste de Tukey (<i>Multiple Comparison Test</i>). Para a frequência de dano usou-se ANOVA <i>2way</i> seguido de Bonferroni <i>posttest</i> . Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$, ambos em relação ao controle negativo.	103
Gráfico 12 - Fragmentação do DNA causado pela biflorina, dacarbazina (dac) 5µM e doxorrubicina (dox) 5µM, às células da linhagem SK-Mel 103 . A. índice de dano em cometa alcalino e neutro; B.1 - frequência de dano por cometa alcalino; B.2 - frequência de dano por cometa neutro. Para o índice de dano usou-se ANOVA <i>oneway</i> seguido do teste de Tukey (<i>Multiple Comparison Test</i>). Para a frequência de dano usou-se ANOVA <i>2way</i> seguido de Bonferroni <i>posttest</i> . Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$, ambos em relação ao controle negativo.	104
Gráfico 13 - Índice de Dano causado pela biflorina, dacarbazina (dac) 5µM e doxorrubicina (dox) 5µM, às células da linhagem nas SK-Mel 19, 28 e 103 (a) por cometa alcalino; (b) por cometa neutro. Para o índice de dano usou-se ANOVA <i>twoway</i> seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$, sendo * comparação SK-Mel 28 e 103 com SK-Mel 19, e # comparação SK-Mel 28 com 103.	105
Gráfico 14 -Índice de Dano causado pela biflorina 1,0, 2,5 e 5,0 µM e 5-azacitidina (5-aza) 10 µM nas SK-Mel 19, 28 e 103 após 24h de tratamento (a) SK-Mel 19; (b) SK-Mel 28; (c) SK-Mel 103. Para o índice de dano usou-se ANOVA <i>oneway</i> seguido do teste de Tukey (<i>Multiple Comparison Test</i>). Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$, sendo * comparação com o sem tratamento (ST); # comparação com o DMSO; • comparação com 5-azacitidina.	107
Gráfico 15 - Quantificação relativa da expressão dos genes <i>MELK</i> , <i>RAD</i> , <i>TYMS</i> e <i>MGMT</i> após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 µM nas células SK-Mel 19 por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA <i>twoway</i> seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.....	108
Gráfico 16 - Quantificação relativa da expressão dos genes <i>MELK</i> , <i>RAD</i> , <i>TYMS</i> e <i>MGMT</i> após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 µM nas células SK-Mel 28 por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA <i>twoway</i> seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.	109
Gráfico 17 - Quantificação relativa da expressão dos genes <i>MELK</i> , <i>RAD</i> , <i>TYMS</i> e <i>MGMT</i> após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 µM nas células SK-Mel 103 por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA <i>twoway</i> seguido do teste de Bonferroni. Consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.	110
Gráfico 18 - Quantificação relativa da expressão dos genes <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>MBD1</i> , <i>MBD2</i> , <i>MBD3</i> , <i>MBD4</i> , <i>MeCP2</i> , <i>MGMT</i> após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 µM nas células SK-Mel 19 por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA <i>twoway</i> seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.	110
Gráfico 19 - Quantificação relativa da expressão dos genes <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>MBD1</i> , <i>MBD2</i> , <i>MBD3</i> , <i>MBD4</i> , <i>MeCP2</i> , <i>MGMT</i> após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 µM nas células SK-Mel 28 por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA <i>two-way</i> seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.	111
Gráfico 20 - Quantificação relativa da expressão dos genes <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3B</i> , <i>MBD1</i> , <i>MBD2</i> , <i>MBD3</i> , <i>MBD4</i> , <i>MeCP2</i> , <i>MGMT</i> após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 µM nas células SK-Mel	

103 por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA <i>twoway</i> seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.....	112
Gráfico 21 - Quantificação relativa da expressão do gene <i>BRAF</i> após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μM nas células SK-Mel 19 por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA <i>twoway</i> seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.....	113
Gráfico 22 - Quantificação relativa da expressão do gene <i>BRAF</i> após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μM nas células SK-Mel 28 por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA <i>twoway</i> seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.....	113
Gráfico 23 -Quantificação relativa da expressão do gene <i>BRAF</i> após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μM nas células SK-Mel 103 por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA <i>twoway</i> seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANPG - *Alkylpurine-DNA-N-Glycosylase* (alquilpurina-DNA-N-glicosilase)

APE1 - *Human AP-Endonuclease* (endonuclease AP humana)

ARF – *Alternative Reading Frame* (armação alternativa de leitura)

AKT – *Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1* (oncogene viral 1 de timoma homólogo a murino)

ATM – *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ataxia telangiectasia mutada)

ATR - *Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related* (ataxia telangiectasia e Rad3 relacionada)

BCL-2 - *B Cell Leukemia/Lymphoma 2* (célula B de leukemia/linfoma 2)

BER – *Base Excision Repair* (reparo por excisão de bases)

BRAF - *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B* (oncogene homólogo de sarcoma murino viral v-raf B)

BRCA – *Breast Câncer 1* (câncer de mama 1)

CC-TT – ligação de bases nitrogenadas citosina-citosina – timina-timina

CDK4 – *Ciclin Dependent Kinase-4* (proteína quinase ciclina dependente)

CDKN2A - *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A* (inibidor 2A quinase ciclina dependente)

cDNA – *complementary DeoxyriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico complementar)

CPDs – *Cyclobutane pyrimidine dimers* (dímeros de ciclobutano de pirimidina)

CTLA-4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4* (proteína 4 associada a linfócito-T citotóxico)

DAC - dacarbazina

DMEM – *Dulbecco's Modified Medium* (meio de cultura Dulbecco modificado)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – *DeoxyriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)

DNMT – *DNA methyl-transferase* (DNA metil-transferase)

DOX - doxorubicina

dTMP – *Deoxytymidine MonoPhosphate* (deoxitimidina monofosfato)

dUMP – *Deoxyuridine MonoPhosphate* (deoxiuridina monofosfato)

DSB – *Duble Strand Break* (quebra de fita dupla)

EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor* (receptor de fator de crescimento epidérmico)

ERCC1 - *Excision Repair Cross-Complementation Group 1* (reparo por excisão cruzada complementar do grupo 1)

ERK – *Extracellular Regulating Kinase* (quinases extracelulares reguladores de sinal)

FDA – *Food and Drug Administration* (administração de alimentos e medicamentos)

FGFR - *Fibroblast Growth Factor Receptor* (receptor de fator de crescimento de fibroblasto)

GG-NER – *Global Genomic Nucleotide Excision Repair* (reparo por excisão de bases global no genoma)

GTP – *Guanosine Tri Phosphate* (trifosfato de guanosina)

GDP-G – *Guanosine Di Phosphate – G* (guanosina difosfato ligada a proteína G)

HGF - *Hepatocyte Growth Factor* (fator de crescimento de hepatócito)

HGFSF - *Hepatocyte Growth Factor Scatter Factor* (fator disseminador de fator de crescimento de hepatócito)

HJ – *Homologous junction* (junção homóloga)

HR – *Homologous Recombination* (recombinação homóloga)

HUS1 - *DNA-Binding Protein H-NS* (proteína ligante de DNA H-NS)

IFN- α – interferon α

INK – *Inhibitory Kinase* (inibidora ciclina quinase dependente)

KIN1 - *Microtubule Affinity-Regulating Kinase Kin1* (quinase reguladora de afinidade de microtúbulo)

KIT - *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog* (oncogene viral homólogo de sarcoma Hardy-Zuckerman 4 felino v-kit)

LDH – Lactato Deshidrogenase

LIG1 - *DNA ligase I ATP-dependent* (ligase I de DNA dependente de ATP)

LIG3 α - *DNA ligase III ATP-dependent* (ligase III de DNA dependente de ATP)

LP-BER – *Long Patch Base Excision Repair* (via longa de reparo por excisão de base)

MAPK – *Mitogenic Activated Protein Kinase* (proteína quinase mitogênica ativada)

MARK - *Microtubule-Associated Protein/Microtubule Affinity-Regulating Kinase* (proteína associada a microtúbulo/ quinase reguladora de afinidade a microtúbulo)

MBP – *Methyl-CpG Binding Proteins* (proteínas ligadores de metil-CpG)

Mc1r – *Melanocortin receptor-1* (receptor de melanocortina 1)

MDM2 – *Mouse Doble Minute 2* (minuto dobrado 2 de camundongo)

MET - *Mesenchymal-Epithelial Transition* (transição epitelial mesenquimal)

MEK - *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase* (proteína quinase mitogênica ativada de regulação de sinal extracelular)

MELK – *Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase* (quinase materna embrionária de leucina)

MGMT – O⁶-metil-guanina-DNA-metil-transferase

MITF - *Microphthalmia-Associated Transcription Factor* (fator de transcrição associado a microftalmia)

MTHFR – *5,10-methylen-tetra-hydrofolate reductase* (5,10-metilenotetrahidrofolato redutase)

MYC - *Myelocytomatosis Oncogene* (oncogene de mielocitomatose)

NBS1 *Nijmegen Breakage Syndrome 1 Protein* (proteína de quebra síndrome de Nijmegen)

NEIL - *Nei Endonuclease VIII-Like* (endonuclease VIII Nei semelhante a de *E. coli*)

NER – *Nucleotide Excision Repair* (reparo por excisão de nucleotide)

NHEJ – *Non Homologous End Joining* (junção não homóloga)

NTH - *Human Thymine Glycol-DNA-Glycosylase*

OGG1 - *8-oxoGuanine DNA Glycosylase* (8-oxoguanina DNA glicosilase)

PAR-1 - *Partitioning-Defective 1* (particionamento defeituoso 1)

PARP - *Poly-(ADP-Ribose) Polymerase* (polimerase poli-ADP-ribose)

PBS – *Phosphate Buffer Saline* (tampão fosfato salino)

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PCNA - *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (antígeno de proliferação do núcleo da célula)

PET – *Positron Emission Tomography* (tomografia de emissão pósitron)

PI3K - *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase* (quinase 3 fosfatidilinositol-4,5-bifosfato)

PNK - *Inorganic Polyphosphate/ATP-NAD Kinase* (fosfato inorgânico/ATP-NAD quinase)

POL β – *Polimerase β* (polymerase β)

POMC – *Proopiomelanocortin* (proopiomelanocortina)

PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog* (homólogo de fosfatase e tensina)

RAD - *Repair DNA ATPase* (ATPase envolvida no reparo de DNA)

RAD54L – *RAD54-Like* (RAD54 semelhante a RAD de *Saccharomyces cerevisiae*)

RAF – *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog* (oncogene homólogo de sarcoma murino viral v-raf)

RAS – Rat Sarcoma (sarcoma de rato)

Rb –*Retinoblastoma protein* (proteína retinoblastoma)

RFC - *Replication Factor C Small Subunit* (subunidade pequena de fator C de replicação)

RNA – *RiboNucleic Acid* (ácido ribonucleico)

RPA - *Replication Protein A* (proteína A de replicação)

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

ssDNA – *single strand DNA* (fita simples de DNA)

SLNB – *Sentinel Lymph Node Biopsy* (mapeamento linfático por linfocintilografia)

SMC1 - *Structural maintenance of chromosomes 1* (manutenção estrutural de cromossomos)

SP-BER - *Short-Patch Base Excision Repair* (via rápida de reparo por excisão de base)

SSB – *Single Strand Break* (quebra de fita simples)

TDG - *Thymine-DNA Glycosylase* (timina DNA glicosilase)

TDP1 - *Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1* (tirosil DNA fosfodiesterase 1)

TERT - *Telomerase Reverse Transcriptase* (transcriptase reversa de telomerase)

TFIIH - *Strictosidine Synthase-Like 1 Transcription Factor* (fator de transcrição de estrictosidina sintase)

TNM – Tumor Nódulo Metástase

TP53 – *Tumor Protein p53* (proteína tumoral p53)

TYMS – *Thymidylate Synthase* (timidilato sintetase)

UDG - *Uracil-DNA-Glycosylase* (uracil DNA glicosilase)

XPA - *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group A* (grupo A complementar de Xeroderma pigmentoso)

XPC - *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group C* (grupo C complementar de Xeroderma pigmentoso)

XPF - *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group F* (grupo F complementar de Xeroderma pigmentoso)

XPG - *Xeroderma Pigmentosum Complementation Group G* (grupo G complementar de Xeroderma pigmentoso)

XRCC1 - *X-Ray Repair Complementing Defective Repair in Chinese Hamster Cells 1* (reparo a raio-X complementando reparo defeituoso em células de Hamster chinês 1)

α -MSH – *α Melanocyte Stimulating Hormone* (hormônio estimulador de melanócito α)

THF – *Tetra Hydro Folate* (tetrahidrofolato)

6-4PPs – *6-4-pyrimidine photoproducts* (6-4-fotoprodutos de pirimidina)

8-oxoG - *8-oxo-7,8-dihydroguanosine* (8-oxo-7,8-dihidroguanosina)

ϵ C - *3,N⁴-ethenocytosine* (3, N⁴-etenocitosina)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Câncer.....	19
2.2	Mecanismos de reparo aos danos ao DNA.....	23
2.3	Apoptose.....	28
2.4	Epigenética do câncer.....	31
2.5	Melanoma.....	35
2.6	Biflorina	58
3	OBJETIVOS.....	63
3.1	Objetivo Geral	63
3.2	Objetivos Específicos	63
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
4.1	Tipo de estudo	64
4.2	Obtenção da biflorina	64
4.3	Linhagens celulares	64
4.4	Avaliação da citotoxicidade	65
4.5	Avaliação da morfologia celular	68
4.6	Mecanismo de morte celular	68
4.7	Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa.....	70

4.8	Análise da expressão de genes por RT-PCR.....	74
5	RESULTADOS	77
5.1	Avaliação da citotoxicidade	77
5.2	Avaliação da morfologia celular	87
5.3	Mecanismo de morte celular	92
5.4	Ensaio de eletroforese em gel de célula única – Teste do Cometa	99
5.5	Análise da expressão de genes por RT-PCR.....	108
6	DISCUSSÃO	115
7	CONCLUSÃO.....	127
8	FINANCIAMENTO	129
9	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	130
10	REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

O câncer compreende um conjunto de doenças que se caracterizam pela presença de células em crescimento contínuo e descontrolado, com propriedades de migração, invasão e destruição do tecido adjacente, além de ser capaz de se proliferar em outros órgãos caracterizando o processo de metástase (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Essas propriedades são adquiridas através da desregulação da expressão de genes. Alguns genes tem sua expressão aumentada, enquanto outros são suprimidos ou até deletados. O nível de expressão gênica associado com o câncer influencia os processos celulares de proliferação, apoptose e invasão. Sendo assim, se torna fundamental esclarecer quais genes tem sua expressão aumentada ou diminuída nos tumores, já que podem representar alvos terapêuticos relevantes (SHEPHERD; PUZANOV; SOSMAN, 2010).

Em contraste com a estabilização ou declínio do número de casos na maioria dos tipos de câncer, o melanoma de pele se destaca pela alta incidência, alto potencial metastático, agressividade e resistência aos tratamentos convencionais, caracterizando uma doença com alta morbimortalidade e baixa taxa de sobrevida. Tais características justificam as diversas pesquisas que tem sido feitas para entender a biologia e a genética molecular, identificando vias de sinalização críticas para a iniciação e progressão dessa neoplasia. Significativamente, esses passos têm resultado no desenvolvimento de novos alvos para o tratamento do melanoma (KO; FISHER, 2011; SIEGEL et al., 2014).

Geneticamente, o melanoma apresenta alterações em três vias moleculares: MAPK (*Mitogenic Activated Protein Kinase* - proteína quinase mitogênica ativada), que resulta em mutações em *RAS*, *RAF* e *KIT*; PI3K (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate-3-Kinase* quinase - 3 fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) /AKT (*Murine Thymoma Viral Oncogene*

Homolog 1 - oncogene viral 1 de timoma homólogo a murino), como consequência da mutação em *RAS*, mutações ou perda de *PTEN* (*Phosphatase and Tensin Homolog* - homólogo de fosfatase e tensina); desregulação na expressão de *AKT*; e mutações em *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A* - inibidor 2A quinase ciclina dependente), *ARF* (*Alternative Reading Frame* - armação alternativa de leitura) e *TP53* (*Tumor Protein p53* – proteína tumoral p53). Tais alterações são consideradas importantes alvos para terapia do melanoma (WANGARI-TALBOT; CHEN, 2013).

Levando-se em consideração o fato da quimioterapia ser uma terapêutica agressiva e debilitante, estratégias que visam o desenvolvimento de moléculas com maior eficácia terapêutica, menor incidência de efeitos adversos, seletivos e alvo-específicos vêm sendo estudadas. A biflorina, uma *o*-naftoquinona isolada das raízes da *Capraria biflora*, é apontada em diversos estudos como uma droga potencialmente antitumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em diferentes tipos de tumores e linhagens tumorais inclusive de melanoma murino e humano, imunoestimulante, genotóxica, e não mutagênica (VASCONCELLOS et al., 2005; AQUINO; LIMA, 2006; VASCONCELLOS et al., 2007; VASCONCELLOS et al., 2010; VASCONCELLOS et al., 2011).

Esse trabalho propôs-se a avaliar o potencial citotóxico da biflorina em células de melanoma humano verificando o tipo de morte celular, genotoxicidade e capacidade de alterar a expressão de genes envolvidos nos mecanismos de progressão do ciclo celular, replicação do DNA, reparo celular e na metilação do DNA dessas células, como forma de entender o mecanismo de citotoxicidade da biflorina e favorecer a sua utilização como futuro agente antitumoral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

Danos ao DNA podem ocorrer de diversas maneiras (figura 1). O DNA pode sofrer danos devido a ação de agentes exógenos, tais como radiação ultravioleta, agentes alquilantes, ou devido a agentes endógenos, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, erros na replicação do DNA. Cada tipo de dano ao DNA requer respostas celulares específicas para lidar com a natureza peculiar do dano. Independentemente do tipo de dano ao DNA, a resposta envolve a identificação do dano (sensores), ativação de pontos de checagem do ciclo celular, reparo das lesões ou indução de morte programada. O dano ao DNA resultante pode causar quebra de fita simples (SSB) ou quebra de fita dupla (DSB), e a evasão do reparo resulta na transformação celular, podendo ser mutagênica, afetando a expressão de múltiplos genes e ativando a carcinogênese (KHANNA; JACKSON, 2001; KASTAN; BARTEK, 2004).

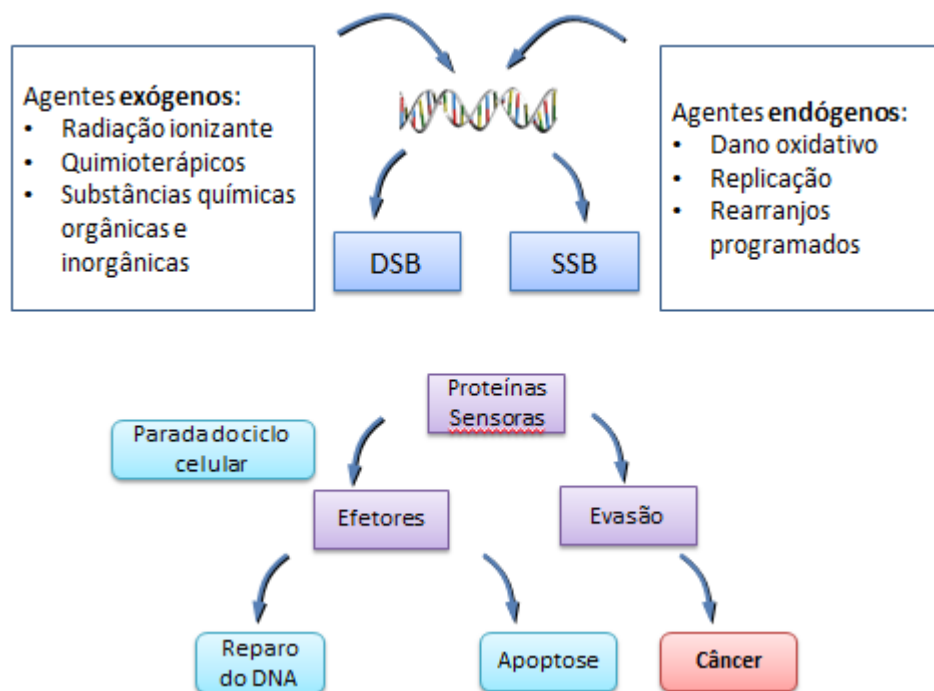


Figura 1 - Esquema da organização geral das respostas ao dano ao DNA. Adaptado de Khanna & Jackson, 2001

Em síntese, caso a célula não consiga reparar o dano sofrido e/ou não haja a indução da morte celular programada, inicia-se o processo de carcinogênese. Tal processo é dividido didaticamente em três etapas: iniciação, promoção e progressão. A iniciação ocorre após a exposição a agentes mutagênicos e resulta em mudanças pequenas ou não observáveis na morfologia celular ou tecidual, mas confere um aumento permanente na susceptibilidade a formação do câncer. A promoção é o processo de estimulação da proliferação das células iniciadas com a eventual formação de tumores não invasivos (*in situ*). A subsequente progressão requer a interrupção adicional do tecido, as células são capazes de adquirir mutações adicionais, tornando-as malignas e metastáticas, conferindo a essa população celular vantagem seletiva em relação às células vizinhas (WILSON, 2012).

Efeitos mutagênicos e carcinogênicos resultantes de um dano ao DNA são sequelas da genotoxicidade. A genotoxicidade é um processo pelo qual um agente interage com o DNA ou outro alvo celular que controla a integridade do material genético. Isso inclui a indução de adutos de DNA, quebras na fita de DNA, pontos de mutação, mudanças numéricas ou estruturais nos cromossomos. Agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente como os que possuem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000).

Em consequência aos eventos anteriores, os cânceres se originam a partir de uma célula anormal que, burlando os mecanismos de reparo convencionais, desenvolvem a capacidade de transmitir essa anormalidade as células filhas. A anormalidade adquirida ou herdada é causada por uma alteração genética (na sequência de DNA) ou epigenética (no padrão de expressão dos genes, sem que haja mudança na sequência de DNA) que resulta no desenvolvimento da neoplasia. Tais alterações decorrem da ação de um agente carcinogênico

e/ou mutagênico com capacidade de causar danos ao DNA (HANAHAH; WEINBERG, 2011; KHANNA; JACKSON, 2001).

O tumor, além de ser uma massa de células em constante proliferação, é um tecido complexo composto por múltiplos tipos celulares que participam de interações heterotípicas e contribuem para o desenvolvimento de capacidades inerentes do tecido tumoral. Dentre essas características destaca-se: (1) sinalização celular sustentada, em que as células neoplásicas produzem fatores de crescimento e se tornam hiper-responsivas, resultando em estimulação proliferativa autócrina; (2) instabilidade genômica; (3) evasão de supressores de crescimento; (4) evasão do mecanismo de inibição do crescimento por contato; (5) indução de angiogênese; (6) ativação da invasão e metástase (HANAHAH; WEINBERG, 2011).

A adaptação metabólica à elevada exigência energética durante o desenvolvimento do câncer é inerente às neoplasias. Células neoplásicas superam a dependência de fatores de crescimento adquirindo mutações genéticas que funcionalmente alteram receptores de iniciação de vias de sinalização. Existe forte evidência de que algumas dessas vias ativam constitutivamente a captação e metabolismo de nutrientes que promovem a sobrevivência e crescimento celular. Mutações em oncogenes podem resultar na absorção de nutrientes, particularmente glicose, que atendem ou excedem as demandas energéticas de crescimento e proliferação celular. Um melhor entendimento sobre a ligação entre o metabolismo celular e o controle do crescimento tem levado ultimamente a novas alternativas terapêuticas para o câncer (MATTHEW G. VANDER HEIDEN, LEWIS C. CANTLEY, 2010).

O folato funciona primeiramente na transferência e processamento de uma unidade de carbono, reações que são essenciais para a nova metilação da homocisteína para formar metionina, para a síntese de timidilato e purinas, e para a provisão de grupos metil necessários

para várias reações de metilação. Timidilato sintetase (*thymidylate synthase* – TYMS) é a enzima chave na via metabólica folato/homocisteína, pois catalisa a conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) a deoxitimidina monofosfato (dTMP) proporcionando assim a única fonte de dTMP. Essa reação é essencial para a síntese de pirimidinas e para a replicação e reparo do DNA. O componente principal dessa via é o 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metileno-THF), pois age como cofator das enzimas TYMS e 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR). Quando a quantidade de folato está reduzida, 5,10-metileno-THF é capaz de restringir a produção de 5-metil-THF, impedindo a remetilação da homocisteína à metionina e resultando na elevação plasmática de homocisteína ou impedindo a biossíntese de pirimidina e afetando o processo que proliferação dependente de ácidos nucleicos (KEALEY et al., 2005).

A expressão do gene *TYMS* é controlada pelo fator de transcrição E2F que está ligada à regulação do ciclo celular e proliferação, e a inibição da enzima timidilato sintase resulta na parada do ciclo celular. Estudos indicam que a expressão dessa enzima está aumentada em vários tipos de câncer, tais como: mama, bexiga, cervical, rins, pulmão e trato gastrintestinal. O aumento da expressão de *TYMS* também está associado ao desfecho clínico indesejável, resultando em habilidades celulares invasivas e metastáticas, sugerindo a ação de *TYMS* como oncogene. Como consequência, *TYMS* tem sido reconhecido como alvo efetivo em terapias anti-cancer, e alguns inibidores de *TYMS* tem sido testados clinicamente. Entre os medicamentos descobertos, destaca-se a 5-fluouracil (5-FU) bastante efetiva apesar dos diversos efeitos adversos (FURUTA et al., 2010; KOTOULA et al., 2012; RAHMAN et al., 2004).

Outro gene envolvido no processo de tumorigênese é a quinase materna embrionária de leucina (*maternal embryonic leucine zipper kinase* – MELK). Tal gene codifica as proteínas serina/treonina quinase 38 (MPK38) e Eg3 em murinos (GIL et al., 1997; CHARTRAIN;

ROGHI; PHILIPPE, 2002). MELK é uma proteína quinase-dependente do ciclo celular pertencente à família KIN1/PAR-1/MARK participando de diversas atividades metabólicas tais como ciclo celular (DAVEZAC et al., 2002), proliferação celular (NAKANO et al., 2005; KIM et al., 2012; JIANG; ZHANG, 2013), apoptose (JUNG et al., 2008; SEONG & HÁ, 2012), através da interação com diversas proteínas que afetam várias etapas da carcinogênese (CHUNG; NAKAMURA, 2013). MELK é reativado e apresenta aumento na sua expressão em células tronco neoplásicas, levando a vantagens de crescimento e proliferação celular sendo, portanto, assim como o gene *TYMS*, um potencial alvo terapêutico.

2.2 Mecanismos de reparo aos danos ao DNA

A integridade do genoma enfrenta constantes ataques de diversos tipos de danos ao DNA. Para que a célula permaneça viável, são acionados mecanismos de parada do ciclo celular, constituindo os pontos de checagem, e ativação de mecanismos de reparo ao DNA.

A atividade de quinase é o primeiro passo para ativação das vias de inibição da progressão do ciclo celular após dano ao DNA. A introdução de uma quebra de fita dupla (DSB – *double strand break*) de DNA leva a mudança de conformação na proteína ataxia talanctesia mutada (ATM - *ataxia telangiectasia mutated*). Isso estimula a quinase a fosforilar a serina 1981 (sítio de fosforilação induzida por dano), causando a dissociação do homodímero. O monômero de ATM ativado pode então fosforilar seus inúmeros substratos, tais como a proteína p53 no núcleo, ou as proteínas de quebra NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*), BRCA1 (*breast cancer 1*) e SMC1 (*structural maintenance of chromosomes 1*) nos sítios de quebra de DNA. Associado ao ATR (*AMT- and Rad3-related*), várias outras proteínas ou complexos proteicos podem ser recrutados para a correção de quebras de fita simples (*single strand break* – SSB). Dentre estas incluem RAD17, RSR, complexo RAD9-

RAD1-HUS1 ligantes de cromatina. Todos esses eventos são requeridos para a ativação apropriada dos pontos de checagem do ciclo celular. Em especial a ATR é ativada em resposta a hipóxia e inibidores da replicação de DNA, sendo crítica na resposta aos danos no DNA que afetam a progressão da forquilha de replicação, particularmente agentes que introduzem adutos volumosos de DNA, tais como irradiação ultravioleta, agentes alquilantes ou produtores de ligação cruzada (*crosslinking*) (KASTAN; BARTEK, 2004).

Dentre as vias de reparo acionadas após danos à fita de DNA, existe o reparo por excisão, direto-reverso, reparo pós-replicação e a recombinação. Os dois tipos principais de reparo por excisão são: reparo por excisão de bases (*base excision repair* - BER) e reparo por excisão de nucleotídeo (*nucleotide excision repair* - NER). O BER é a principal via de reparo de danos oxidativos ao DNA. O mecanismo inicia pelo reconhecimento e excisão da base danificada por DNA-glicosilases específicas. Em seguida, AP-endonucleases hidrolisam ligações fosfodiéster na extremidade 5' do sítio AP do DNA de fita simples resultante; estimulam a excisão bases danificadas, 8-oxoG e εC pelas glicosilases OGG1 e TDG; iniciam a inserção do reparo, pela clivagem da ligação fosfodiéster adjacente ao nucleotídeo da base com dano. Após a inserção do reparo, BER pode continuar por duas vias alternativas: via rápida (*short patch base excision repair* - SP-BER) ou via longa (*long patch base excision repair* - LP-BER). Durante SP-BER somente um nucleotídeo é incorporado pela DNA polimerase-β que também remove a base na extremidade 5' danificada e reconstitui a fita. No LP-BER um longo fragmento de 2 a 12 nucleotídeos são retirados e sintetizados novamente. Inicialmente, a DNA-polimerase alonga a extremidade 3' e remove o fragmento de DNA que contém 5'deoxiribofosfato. Subsequentemente, a estrutura resultante é clivada pela endonuclease e o primeiro nucleotídeo é inserido pela DNA polimerase β, enquanto que os outros são inseridos pela DNA polimerase δ e ε. O ultimo estágio de BER é a ligação dos fragmentos reparados. Na SP-BER atua a ligase LIG3α e no LP-BER a ligase LIG1. Ambas

atuam em conjunto com outras proteínas tais como XRCC1, OGG1, NEIL1, NEIL2, ANPG, NTH1, APE1, PNK, TDP1, PARP1, PARP2, POL β . Dentre elas destaca-se a PARP1 (*polyADP ribose polymerase* – polimerase poli- ADP ribose) que se liga à extremidade livre de DNA e a protege contra degradação, participa do relaxamento da cromatina e modula a ligação das proteínas de reparo ao sítio com o dano pela interação com as cadeias poli-ribose-ADP (TUDEK, 2007; NAG; SMERDON, 2009).

O reparo por excisão de nucleotídeo (NER) ocorre em quatro etapas: reconhecimento do dano ao DNA, excisão de um oligonucleotídeo de 24 a 32 resíduos contendo o dano ao DNA pela incisão dupla em cada lado da lesão da fita danificada, preenchimento do espaço resultante pela DNA-polimerase, ligação da incisão. Em células humanas, a reação NER requer pelo menos seis complexos de proteínas para o reconhecimento da incisão dupla (XPA, XPC-Hhr23b, RPA, TFIIH, XPG e XPF-ERCC1) e outros fatores de reparo para síntese e ligação do DNA (PCNA, RFC, DNA-polimerase α ou δ e DNA ligase1). O NER consiste em duas sub-vias: reparo genômico global (GG-NER- *global genomic NER*) que é transcrição dependente e remove lesões do genoma inteiro, e reparo de transcrição acoplada (TC-NER). Fotoprodutos de 6-4-pirimidona (*6-4-pyrimidine photoproducts* 6-4PPs) que dispõe de DNA mais que dímeros de ciclobutano pirimidina (*cyclobutane pyrimidine dimers* CPDs), são removidas rapidamente, predominantemente por GG-NER (URA; HAYES, 2002).

Quebra de fita simples de DNA (*single strand break* - SSB) é a descontinuidade de uma das fitas da dupla hélice e geralmente é acompanhada pela perda de nucleotídeo e dano na terminação 5' e/ou 3' no sítio de quebra. Existem diferentes mecanismos de reparo de SSB tais como BER e desintegração de açúcar. Porém a mais utilizada é a via de reparo global que pode ser dividida em quatro etapas: detecção, processamento da terminação do DNA, preenchimento do espaço (gap) na fita de DNA e ligação do DNA. A detecção ocorre pela

ação de PARP1 que é responsável por promover a acumulação focal e estabilização de complexos proteicos no sítio de reparo de SSB. Outra molécula importante é a proteína complementar de reparo (*X-ray repair cross-complementing protein 1* - XRCC) que funciona como esqueleto molecular que interage, estabiliza e estimula os múltiplos componentes enzimáticos do processo de reparo de SSB. O preenchimento do espaço (gap) na fita de DNA e ligação do DNA ocorre pela ação de polinucleotídeos quinases, fosfoglicolases, endonucleases, polimerases, constituindo a etapa com a maior diversidade enzimática (CALDECOTT, 2008).

Quando duas quebras nas fitas de DNA estão próximas uma da outra, mas em fitas de DNA opostas, ocorre a quebra de fita dupla (*double-strand break* - DSB). Ao ocorrer DSB, como forma de proteger genes essenciais ou ativar a apoptose, as células ativam seus mecanismos de reparo. Genes do grupo de epistase (quando o efeito de um gene depende da presença de um ou mais genes modificadores) do *RAD52*, tais como *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55-57*, *RAD59*, *MRE11*, *XRS2* e *RFA1* são responsáveis pelo reparo a danos de fita dupla de DNA dependentes de recombinação. Para reparar quebras de fita dupla, a terminação de DNA é primeiramente processada para produzir fita simples 3' do DNA duplex (ssDNA). O ssDNA é então canalizado para uma das várias vias de reparo (WU; KANTAKE; KOWALCZYKOWSKI, 2008).

Existem dois mecanismos complementares de reparo: a recombinação homóloga (HR) e a junção final não homóloga (NHEJ) (Figura 2). Na HR a porção final do DNA é retirada por nucleases na direção 5'-3'. A fita simples resultante invade a dupla hélice homóloga, molécula parceira sem dano, e é estendida pela DNA-polimerase, que copia a informação da parceira. O cruzamento de DNA resulta em duas moléculas de DNA intactas. Por outro lado, na NHEJ, o fim das duas fitas de DNA são simplesmente ligadas. Nesse mecanismo não é necessária uma fita parceira sem dano e nem depende de homologia entre os

dois finais recombinantes. Tal processo está susceptível a erros, podendo ser introduzidas pequenas sequencias com deleção (KHANNA; JACKSON, 2001).

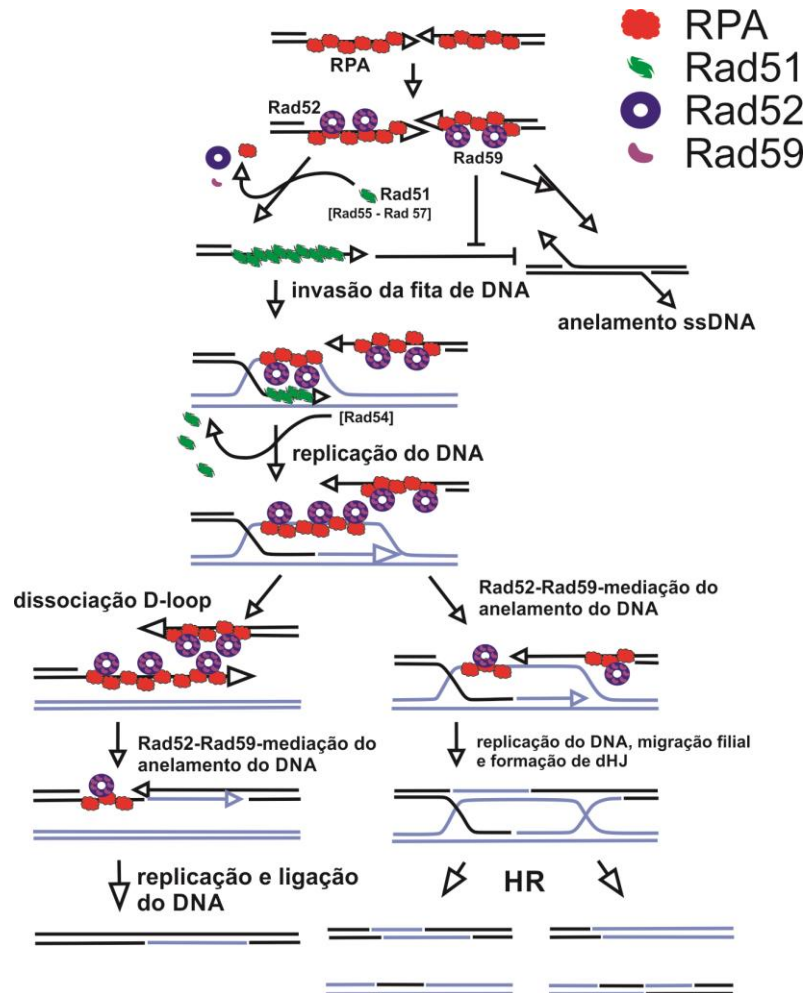


Figura 2 - Vias de reparo de quebras de fita dupla. HR – reparo homólogo; NHEJ – junção final não-homóloga; RPA – proteína A de replicação; Rad 52 – proteína ligadora do DNA; Rad 51 – proteína formadora de filamento de DNA para invasão da fita. Adaptado de Wu et al., 2008).

Ambas as vias compartilham a ressecção do DNA e a ligação da proteína RPA a calda 3'-ssDNA. A interação sítio-específica entre RPA e a proteína Rad52 recruta Rad52 e Rad59 para o complexo RPA-ssDNA. Na via de junção final não-homóloga (à esquerda), Rad52 promove o anelamento de RPA-ssDNA com a sequência complementar da outra terminação de DSB processada. Rad59 realiza um importante papel melhorando a atividade de anelamento ao DNA pela Rad52 e neutralizando o efeito inibitório da proteína Rad51. A formação de um filamento de nucleoproteína inibe fortemente o anelamento de DNA mediado

pela Rad52. Em seguida, a Rad51 é removida pela Rad54 e a replicação do DNA é iniciada a partir da fita invadida. Após a síntese de DNA, o mesmo é desenrolado pelo deslocamento circular (D-loop) e anelado à outra terminação de DNA processada Rad52-dependente. Após a síntese de DNA há a migração, clivagem e a ligação para o completo reparo de DSB (figura 2) (WU; KANTAKE; KOWALCZYKOWSKI, 2008).

Outra via de reparo é comandada pela O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase – MGMT. Essa via é responsável por reparar adutos O⁶-alquilado, tais como: O⁶-metil-guanina (O⁶MeG) e O⁶-metil-timina (O⁶MeT), implicados em lesões carcinogênicas. A ação da enzima MGMT ocorre por uma reação de transferência do grupo alquil de um oxigênio no DNA para um resíduo de cisteína no sítio catalítico de MGMT, restaurando assim o DNA e inativando MGMT. Cada molécula de MGMT é capaz de reparar um aduto alquil, sendo assim a capacidade de remoção de adutos depende do número total de MGMT por célula e da taxa de síntese de MGMT. Caso não reparados, os danos podem levar a morte celular, aberrações cromossômicas, mutações e câncer (KAINA et al., 2007).

2.3 Apoptose

A morte celular é uma estratégia essencial para o controle do equilíbrio do sistema vivo. Pode resultar de processos patológicos sendo iniciada após a percepção de estímulos específicos que levam a mudanças em cascatas intracelulares. O processo de morte pode ser reversível até que ocorra ativação massiva de caspases, perda do potencial transmembrana da mitocôndria, permeabilização completa da membrana mitocondrial externa ou exposição de resíduos de fosfatidilserina. Sendo assim, uma célula pode ser considerada morta quando um desses critérios é encontrado: perda de integridade de membrana, fragmentação da célula e/ou do núcleo em pequenos corpos (corpos apoptóticos), incorporação dos restos celulares por células vizinhas (KROEMER et al., 2005).

A morte celular pode ocorrer por diversos mecanismos levando a morfologias distintas. Dentre os tipos de morte existentes, apoptose, necrose, autofagia, oncose, catástrofe mitótica, excitotoxicidade, degeneração walleriana, cornificação, as duas primeiras são as mais estudadas. O processo de apoptose envolve uma sequência de lise do citoplasma, aumento da densidade citoplasmática, condensação da cromatina e segregação em uma massa que engloba a membrana celular e pode formar uma protrusão (*budding*), seguido do aparecimento dos corpos apoptóticos, sendo que a membrana nuclear permanece intacta por um longo período de tempo. Em contraste, células necróticas apresentam fragmentação da cromatina em massas indefinidas, fragmentação das organelas, finalizando com o rompimento da membrana e a desintegração celular (MAJNO; JORIS, 1995; SGONC; GRUBER, 1998; SARASTE; PULKKI, 2000; VAN CRUCHTEN; VAN DEN BROECK, 2002; RODRIGUEZ; SCHAPER, 2005; HUERTA et al., 2007).

Morte celular por apoptose é diferenciada da necrose pela compactação nuclear inicial em massas definidas e densas para a periferia nuclear, condensação citoplasmática, fragmentação do núcleo. A célula progressivamente se desintegra formando os corpos apoptóticos com organelas intactas. O evento bioquímico mais claro da apoptose é a fragmentação nucleossomal. Ao contrário das células necróticas, as células apoptóticas mantêm a integridade da membrana seguindo o evento de fragmentação nuclear (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

Um dos eventos bioquímicos que marcam a apoptose é a quebra do DNA por DNAses endógenas, que corta as regiões internucleossomais em fragmentos de fita dupla de DNA produzindo múltiplos fragmentos de aproximadamente 180 a 200 pb. Esse fenômeno é o mais frequentemente analisado em eletroforese em gel de agarose, cujo apresenta um padrão de fragmentação do DNA em formato de uma escada de DNA ou *DNA ladder* (MAJNO;

2.4 Epigenética do câncer

Epigenética se refere a mudanças hereditárias na expressão gênica que não são causadas por mudanças na sequência de DNA. Os mecanismos mais estudados de regulação epigenética são: a metilação do DNA e as modificações pós-transcricionais das histonas (GREENBERG et al., 2014).

A metilação do DNA se refere a adição de um grupo metil a uma das quatro bases que constituem o código genético (figura 4), sendo um importante processo para transmissão de informação genética e regulação da expressão gênica. Em humanos, o grupo metil é normalmente adicionado ao carbono 5' da citosina seguido pelo nucleotídeo guanina, formando um dímero chamado CpG por meio da atividade da DNA metiltransferase (DNMTs). Em geral, o genoma dos mamíferos são altamente metilados, cerca de 60% a 90% em CpGs. Porém, existem regiões ricas em CpGs chamadas “ilhas CpG” que podem fazer parte ou estar próximas a regiões promotoras e, geralmente, não estão metiladas. A metilação do DNA é uma das mais importantes modificações epigenéticas para o controle da transcrição e manutenção da cromatina (SOLÍS-PAREDES et al., 2014).

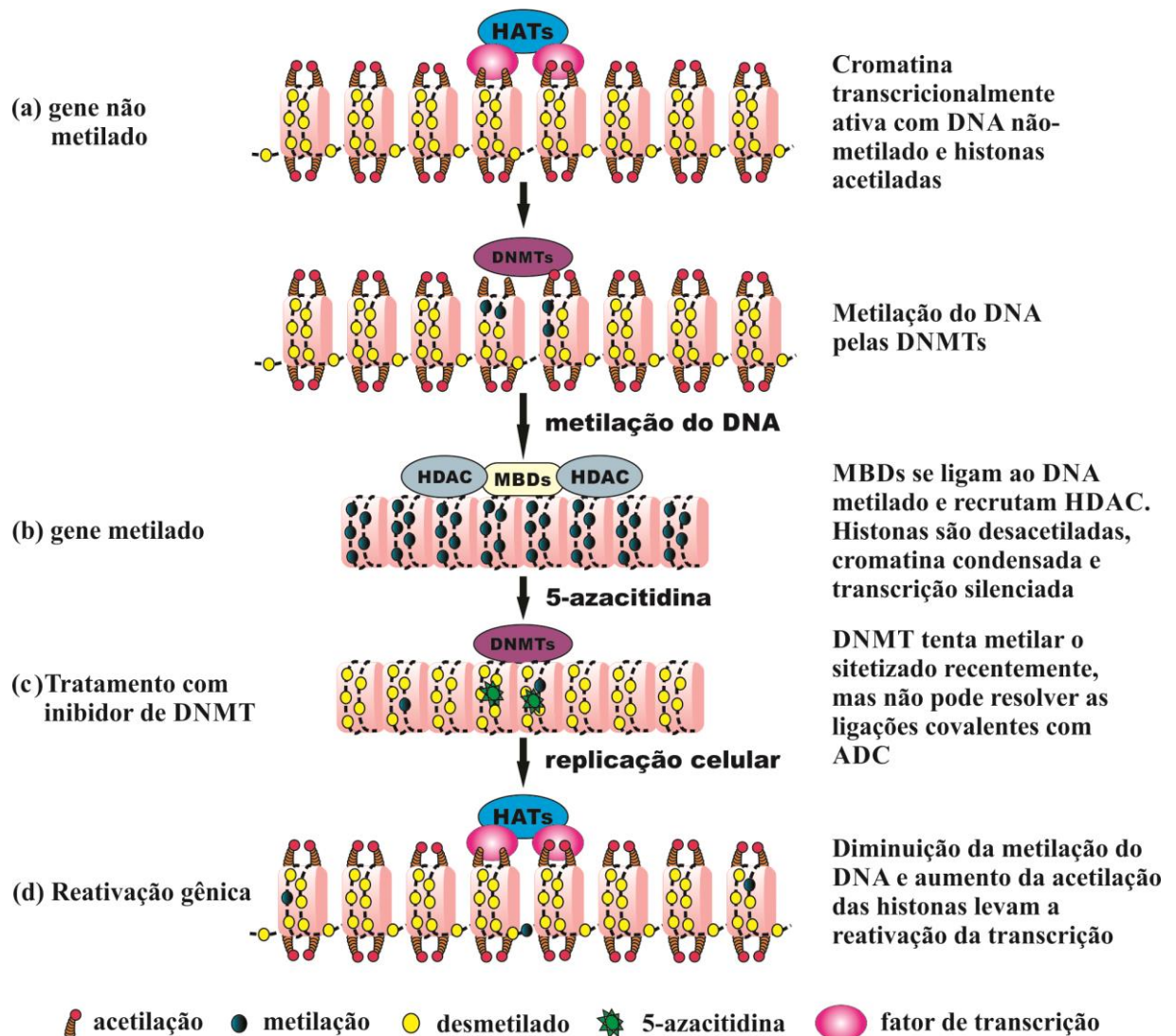


Figura 4 – Diferentes padrões de metilação, modificação das histonas e estrutura da cromatina entre células normais e tumorais. Mecanismo dos inibidores de DNMT. Adaptado de Ren et al., 2011.

DNA metiltransferases são enzimas que metilam o DNA em locais com várias funções tais como silenciamento gênico, inativação do cromossomo X, reparo do DNA, reprogramação de elementos responsáveis pela carcinogênese. Essas enzimas usam como substrato a S-adenosil-metionina, que é responsável por doar o grupo metil para o nucleotídeo citosina. O mecanismo de ação requer a ligação da DNA metiltransferase a fita de DNA. Essa interação projeta a dupla hélice causando a inversão na base na citosina. O subsequente ataque do nucleotídeo conservado de cisteína no carbono 6 da citosina é seguido pela transferência do grupo metil para a citosina no carbono 5 (ANDREOLI et al., 2013).

Em mamíferos existem três DNA metiltransferases – DNMTs chamadas: DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L. O gene *DNMT1* é essencial no desenvolvimento embrionário, assim como na proliferação e sobrevivência celular, sendo requerida na inativação do cromossomo X, por exemplo. Por outro lado, DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pelo estabelecimento de padrões de metilação do DNA no desenvolvimento inicial de mamíferos e de células germinativas. DNMT3L é cataliticamente inativa e funciona como fator de regulação de células germinativas, principalmente durante a gametogênese e estágios embrionários (JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011).

O sinal epigenético da metilação do DNA é interpretado pela família de proteínas ligadoras de metil-CpGs (*methy-CpG binding proteins* – MBPs) e formado pelas proteínas MeCP1, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MBD5 e MBD6. Tais proteínas reconhecem regiões metiladas simetricamente 5'-CpG- via domínio de ligação metil-CpG (HENDRICH; BIRD, 1998), e são capazes de recrutar complexos co-repressores que podem inibir a transcrição com a adição de enzimas modificadoras de cromatina (HO et al., 2008).

O fundador da superfamília de MBPs é a proteína MeCP2 que é repressor transcricional global e também é capaz de recrutar complexos repressores para silenciar a transcrição via desacetilação das histonas (NAN et al., 1998). A proteína MBD1 possui um padrão complexo de expressão e seu gene apresenta 13 isoformas, diferenciadas pelas suas ligações ao zinco que vai caracterizar suas capacidades de reprimir promotores metilados ou se ligar ao DNA independentemente do status de metilação (JØRGENSEN; BEN-PORATH; BIRD, 2004). O MBD2 medeia a ligação dos complexos repressores ao DNA metilado (GUEZENNEC et al., 2006), enquanto que a MBD3 atua como silenciador de genes metilados (SAITO, MOTOKI; ISHIKAWA, 2002).

Por outro lado, MBD4 é uma proteína que apresenta dupla função: suprimir a mutação de sítios CpG, usando a região N-terminal para ligar-se a regiões metil-CpG; e manter a regulação de DNA metilado, por meio da região C-terminal glicosilase (homóloga das proteínas de reparo por excisão). Esta é responsável por mediar o reparo de regiões CpG hipermutáveis, que são suscetíveis à incompatibilidades, tais como durante a desaminação hidrolítica de 5-metilcitosina a timina ou deaminação de citosina a uracil (KONDO et al., 2005). Por último, as MBD5 e MBD6 são responsáveis por contribuir para a formação e função da heterocromatina (LAGET et al., 2010; PARRY; CLARKE, 2011).

O epigenoma das células neoplásicas apresenta numerosas alterações. Mudanças na metilação do DNA incluem perdas genômicas e ganho de DNA metilado. Isso causa, por um lado, instabilidade genômica e desregulação de tecidos específicos e, por outro lado, silencia genes supressores tumorais que controlam ciclo celular, apoptose e reparo de danos ao DNA. Adicionalmente, os tumores demonstram larga variabilidade de alterações epigenéticas que podem fundamentar as vantagens seletivas das células neoplásicas (HASSLER; EGGER, 2012).

Células tumorais apresentam alta atividade das DNMTs que possuem como alvo o aumento da metilação das ilhas CpGs do genoma tumoral. A hipermetilação das ilhas CpGs em regiões promotoras levam ao silenciamento gênico através da inibição da transcrição ou via recrutamento de remodelamento do complexo co-repressor da cromatina, sendo um dos mecanismos responsáveis pela resistência a apoptose no câncer, pois resulta no silenciamento de supressores tumorais e de genes pró-apoptóticos (GREENBERG et al., 2014).

Compostos para controlar o desequilíbrio de modificações epigenéticas em células tumorais têm sido desenvolvidos com a função de inibir a metilação do DNA. Existem três classes de inibidores da metilação: (a) inibidores de nucleosídeos; (b) inibidores fracos de não

nucleosídeos; (c) inibidores racionalmente desenhados. A 5-azacitidina e a 5-aza-2'-desoxicitidina são inibidores de nucleosídios análogos de citidina que se ligam as DNMTs e as degradam. Em baixas doses, não inibem a proliferação e causam hipometilação (SEYMOUR et al., 2010).

No presente trabalho, investigou-se as modificações na expressão de genes responsáveis pela metilação do DNA, tanto as DNMTs quanto as MBPs, em linhagens de melanoma.

2.5 Melanoma

O melanoma cutâneo primário é definido como uma lesão caracterizada por diferentes formas clínicas. As lesões geralmente se apresentam assimétricas, com bordas irregulares, variação de cor, diâmetro de mais de 6 mm e alargamento ao longo do tempo. As alterações são derivadas da transformação e proliferação de melanócitos, que normalmente residem na camada basal da epiderme (DE BRAUD et al., 2003; BICHAKJIAN et al., 2011).

A etiologia do melanoma está ligada à exposição crônica ao sol e, dentre os principais fatores de risco estão: fenótipo do paciente (mais comum em homens, maiores de 45 anos de idade e pessoas não-brancas), genética, histórico prévio de melanoma na família, prévia manifestação de nevos (DE BRAUD et al., 2003). Os efeitos da exposição aos raios ultravioleta por tempo prolongado causa um dano considerável ao DNA dos melanócitos, principalmente em caucasianos pela reduzida capacidade protetora da melanina, daí a grande associação entre exposição ao sol e aumento no risco de desenvolver melanoma (GANDINI et al., 2005).

Como prevenção primária preconiza-se a diminuição dos fatores de risco, incentivando-se o uso de protetor solar e evitando longos períodos de exposição ao sol ou ao

bronzeamento artificial. Adicionalmente, a prevenção secundária constitui-se em diminuir o tempo para a detecção da doença com o objetivo de evitar a progressão e aumentar a expectativa de cura do paciente (DE BRAUD et al., 2003). A detecção rápida da lesão primária costuma ser decisiva para a progressão da doença considerando-se que cerca de 1/3 dos pacientes que descobrem a doença na fase local ou regional conseguem ser curados (FIELDS; COIT, 2011).

O curso clínico do melanoma é determinado pela sua disseminação (figura 5) e depende do tipo, espessura, localização, taxa de crescimento, tanto vertical quanto horizontal, e histologia do tumor primário. O crescimento progressivo do melanoma tanto em diâmetro quanto em profundidade resulta em lesões ulcerosas e em disseminação local ou sistêmica resultando em metástases (DE BRAUD et al., 2003). O melanoma pode sofrer metástase por via hematogênica ou linfática, sendo esta a de maior ocorrência. As metástases podem se apresentar de várias formas: micro metástase (localizado dentro do linfonodo sentinela, somente detectado via biópsia), metástase satélite (acima de 2,0 cm a partir do tumor primário), metástase em trânsito (localizada entre o tumor primário e o linfonodo) e metástase clinicamente reconhecida (GARBE et al., 2011).

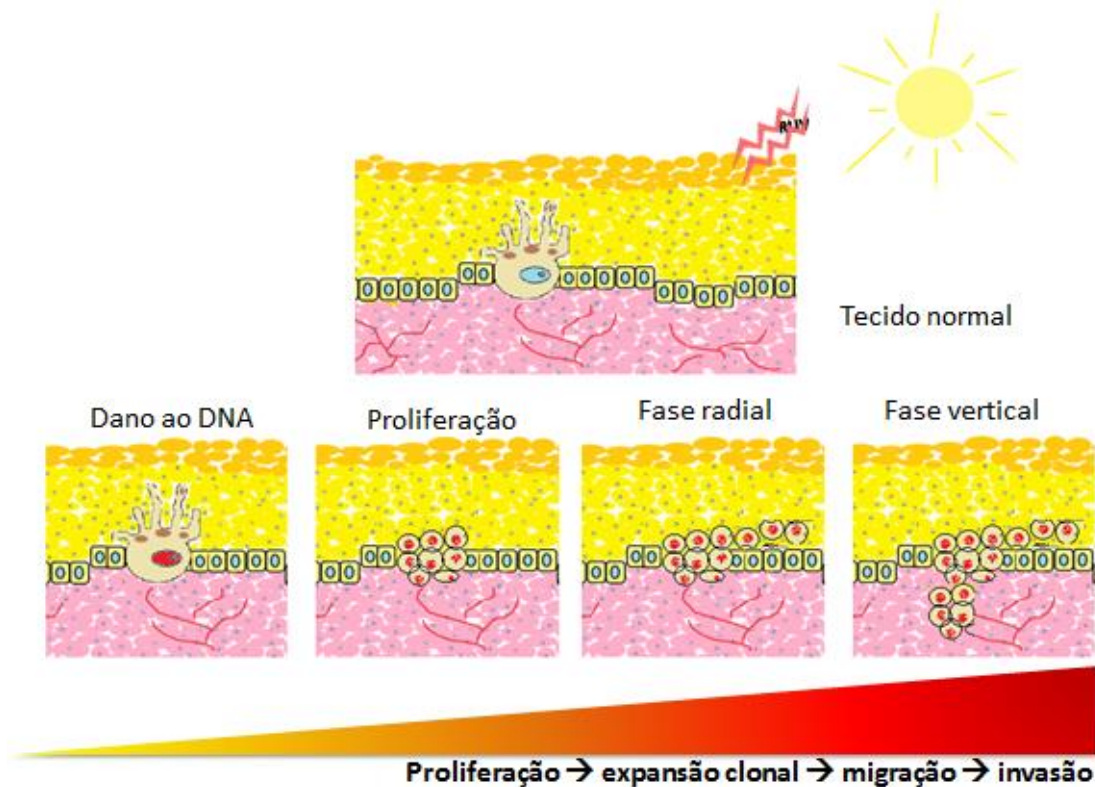


Figura 5 – Desenho esquemático do desenvolvimento do melanoma cutâneo, através dos processos de iniciação, promoção e progressão. Adaptado de DEMIERRE; SONDAK, 2005.

Melanomas diagnosticados na fase primária sem metástase possui uma sobrevida de 10 anos em cerca de 75% a 85%. O prognóstico piora com a idade, sexo masculino e lesões em cabeça, pescoço e tronco. Pacientes com micro metástase possui sobrevida de 10 anos em 30-70%, 30-50% em pacientes com metástase satélite ou em trânsito e, 20-40% em pacientes com metástase em linfonodos regionais. Pacientes com metástases distantes tem média de sobrevivência de 6 a 9 meses dependendo do órgão comprometido e dos níveis de lactado desidrogenase no soro (GARBE et al., 2012).

2.5.1 Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde através do projeto Globocan 2012 da agência IARC (*International Agency for Research on Cancer* – agência internacional para pesquisa em câncer) houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de morte por câncer em todo o mundo, em 2012. Em 2030, prevê-se uma carga global de 21,4

milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento. Em 2012, os tipos mais frequentes de câncer no sexo masculino foram próstata, pulmão e cólon e reto, enquanto que os mais frequentes em mulheres foram mama, cólon e reto e pulmão (CURADO et al., 2007; JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011).

O dado mais recente mundial é de Siegel e colaboradores (2014) que apontam as estatísticas para os Estados Unidos. Neste país o câncer é a segunda causa de morte, perdendo apenas para problemas cardiovasculares. São estimados 1.665.540 novos casos, cerca de 4.500 casos novos diagnosticados diariamente, além de 585.720 casos de morte por câncer, 1.600 mortes por dia. Destes destaca-se 62.570 casos de carcinoma de mama *in situ* e 63.770 novos casos de melanoma. Entre os homens destacam-se os tumores de próstata, pulmão e brônquios, e cólon e reto. Enquanto que os tumores de mama, pulmão e brônquios, e cólon e reto são os mais incidentes em mulheres (SIEGEL et al., 2014).

É incontestável a situação do câncer como problema de saúde pública no Brasil. São estimados, para os anos 2014 e 2015, 576 mil casos novos de câncer (crescimento aproximado de 11% em relação a 2012-2013), incluindo os casos de câncer de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema no país. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira, 182 mil casos novos, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). Em homens, os tipos mais incidentes serão cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (INCA, 2014).

Em contraste com a estabilização e tendência de declínio para maioria dos tipos de câncer, as taxas de incidência de melanoma de pele tende a aumentar em 2014 nos Estados Unidos, juntamente com o adenocarcinoma de esôfago, câncer de tireoide, fígado, pulmão, anus, pâncreas e orofaringe HPV-positivo (SIEGEL et al., 2014).

No Brasil (figura 6), apesar da sua baixa incidência, o câncer de pele melanoma está no grupo de neoplasias cuja letalidade é bastante elevada. Estima-se para 2014 cerca de 2.960 casos novos em homens e 2.930 em mulheres, sendo que as maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região sul. Para a região Norte, estimam-se 80 casos novos de melanoma para homens e 70 para mulheres, sendo que desses apenas 30 casos novos são previstos para o Amazonas (INCA, 2014).

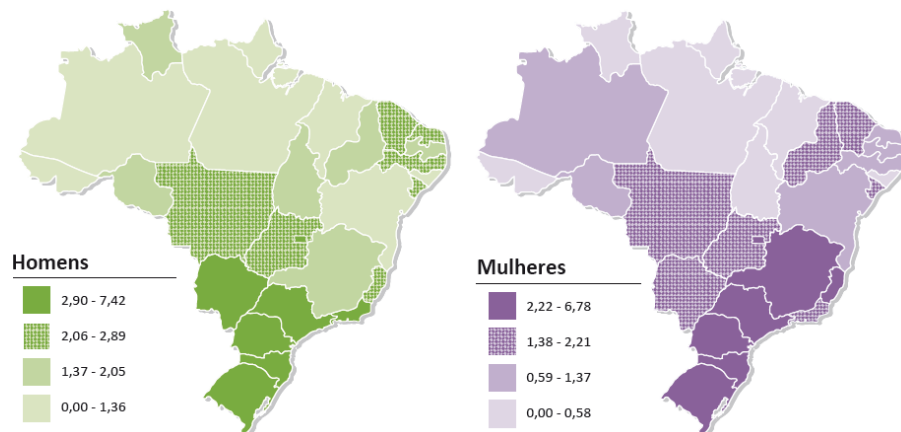


Figura 6 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes homens e mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação quanto ao melanoma maligno da pele. Adaptado de INCA, 2014.

2.5.2 Formas clínicas de melanoma cutâneo

Existem quatro principais subtipos de melanoma: melanoma expansivo superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno e melanoma acral lentiginoso. O melanoma expansivo superficial é o tipo de melanoma mais frequente (50% a 80% dos diagnósticos), ocorre principalmente em áreas expostas ao sol, apresenta lesões com borda irregular e variação de cor do marrom ao rosa e, geralmente, está associado a um bom prognóstico. O

melanoma nodular tem crescimento inicial vertical, apresenta-se nas colorações marrom, preto ou azul escuro. O subtipo lentigo maligno acomete indivíduos mais velhos cronicamente expostos ao sol, aparece na têmpora, nariz, testa, pescoço e antebraço em cores escuras de forma assimétrica e com bordas pouco definidas, histologicamente os melanócitos atípicos estão em proliferação e causam atrofia da epiderme. A forma acral lentiginosa é predominante em populações não brancas, compromete regiões subungueal, palmar e plantar (TUONG; CHENG; ARMSTRONG, 2012).

O quadro a seguir resume algumas das principais formas clínicas de melanoma cutâneo (DE BRAUD et al., 2003; KARAKOUSIS; CZERNIECKI, 2011; COCKERELL, 2012).

Formas clínicas	Principais características
Melanoma <i>in situ</i>	O tumor se encontra confinado na epiderme formado por melanócitos atípicos distribuídos de forma irregular e abaixo da junção derme-epiderme
Melanoma expansivo superficial	Mostra melanócitos atípicos com citoplasma abundante abaixo da epiderme
Melanoma Lentigo Malígnio	Apresenta melanócitos pleomórficos espalhados na junção derme-epiderme
Melanoma nodular	Envolve a derme e forma pápulas e nódulos
Melanoma acrolentiginous	Afeta palma das mãos e sola dos pés e apresenta grande número de melanócitos dendríticos nas camadas superiores da epiderme
Melanoma desmoplástico	É de difícil diagnóstico por se apresentar de diversas formas diferentes tais como: melanócitos delicados, pouco atípicos e arranjados acima da derme ou, derme com colágeno proeminente com células epitelióides e lesão semelhante a cicatriz ou fibroma.
Melanoma verrucoso	Lesões papilares exofíticas com hiperplasia pseudoepitelióide e hiperqueratose
Melanoma nevoide	Derivado de uma lesão nevus que pode evoluir para natureza maligna com pleomorfismo, assimetria e mitose
Nevus azul maligno	Possui proliferação profunda de melanócitos, apresenta células epitelióides, mitoses, necrose, atipia nuclear, pleomorfismo, hiperplasia e núcleos proeminentes
Melanoma infantil	Possui crescimento rápido, sangramento, variação de cor, invasão de linfonodos, produção de massa subcutânea, dor e metástases distantes.

Quadro 1 – Formas clínicas do melanoma cutâneo

2.5.3 Classificação do tumor

O estadiamento do melanoma cutâneo é classificado segundo Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) seguindo as categorias descritas pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) que se baseia na espessura do tumor primário, presença de ulceração e taxa de mitose (BALCH et al., 2009).

Categorias de estadiamento TNM do Melanoma Cutâneo					
Classificação		Espessura (mm)		Ulceração/mitoses	
T					
	Tis	NA			
	T1	≤ 1		A: sem ulceração nem mitose < 1/mm ²	B: com ulceração ou mitose ≥ 1/mm ²
	T2	1,01 – 2,00		A: sem ulceração	B: com ulceração
	T3	2,01 – 4,00		A: sem ulceração	B: com ulceração
	T4	> 4,00		A: sem ulceração	B: com ulceração
Classificação		Nº de nodos metastáticos		Tipo de nodo metastático	
N					
	N0	0		NA	
	N1	1		A: micrometástase	B: macrometástase
	N2	2-3		A: micrometástase	B: macrometástase
	N3	4		Metástases satélites ou em trânsito	
Classificação		Sítio		LDH no soro	
M					
	M0	Sem metástases distantes			NA
	M1a	Metástase distante na pele, subcutânea ou nodal			Normal
	M1b	Metástase no pulmão			Normal
	M1c	Metástases em outros órgãos			Normal ou elevada

Quadro 2 – Categorias de estadiamento TNM do Melanoma Cutâneo. Adaptado de Balch et al, 2009.

2.5.4 Patogenia

Histologicamente (figura 7), quando há um estímulo oncogênico, geralmente radiação ultravioleta crônica, os melanócitos da epiderme na junção dermo-epiderme sofrem vários processos mutagênicos. Os melanócitos mutados se proliferam formando unidades hiper Cromáticas e com um halo ao seu redor (cl clinicamente são manchas claras, quase

imperceptíveis) e que, ao longo do tempo, tornam-se melanócitos atípicos formando grupamentos celulares e migram para as camadas superiores da epiderme (cl clinicamente lesões entre 3-6 mm com pigmento marrom a preto, assimétricas e com bordas irregulares). Ao longo da progressão, a epiderme e as estruturas ao redor passam a ser ocupadas pelos melanócitos atípicos até atingir a derme papilar e estruturas mais profundas como derme reticular e tecido subcutâneo (cl clinicamente aparecem ulcerações, formação de nódulos, coloração variadas de vermelho, azul e branco). O estágio final é caracterizado pelas metástases que se inicia nos linfonodos podendo alcançar outros órgãos (COCKERELL, 2012).

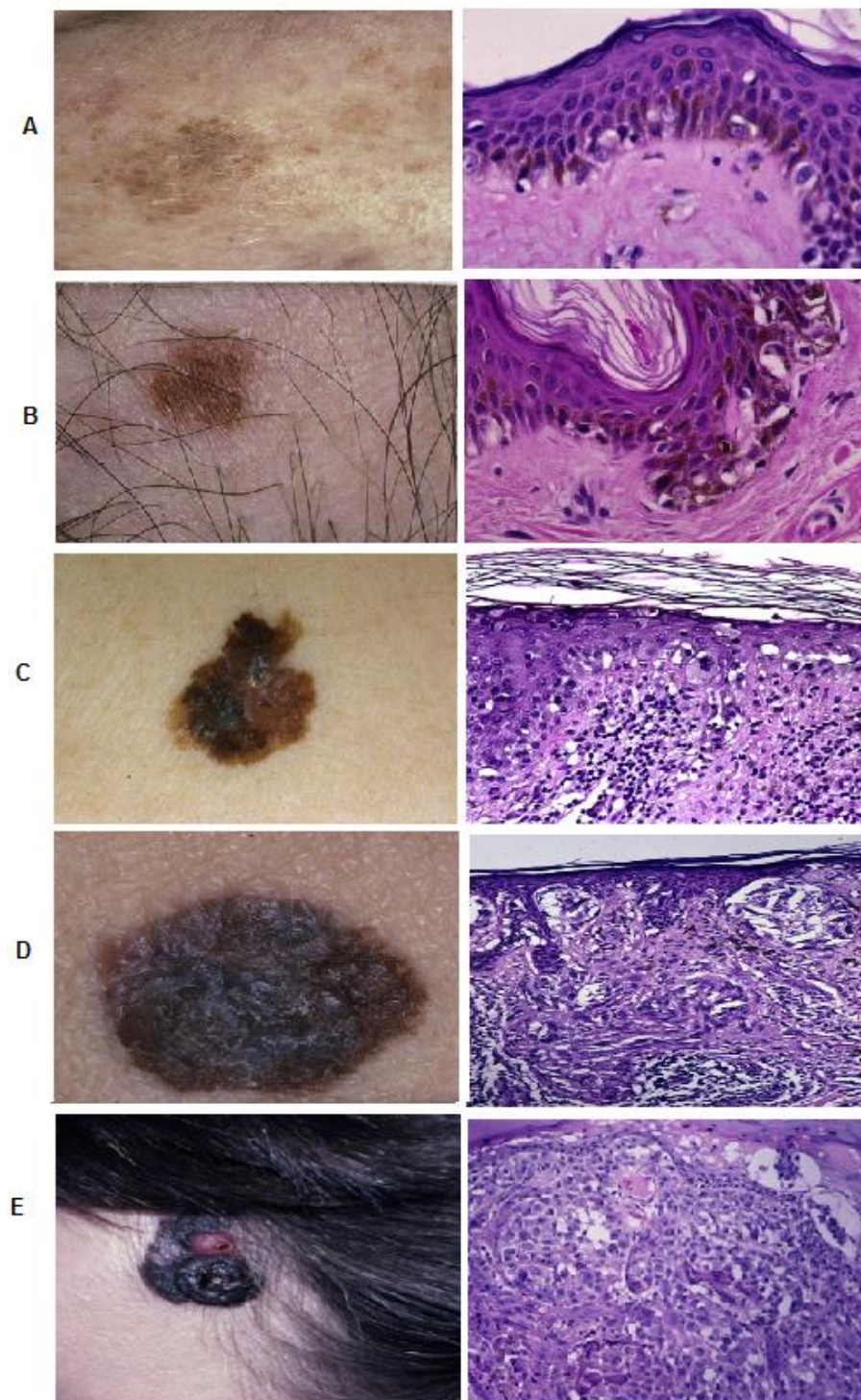


Figura 7 – A. melanoma inicial com proliferação de células hipercromáticas; B. lesão hiperpigmentada de melanoma intermediário com bordas irregulares produzidas por melanócitos coalescentes formando agregados celulares; C. lesão mais tardia com assimetria e variedade de coloração apresentando melanócitos atípicos; D. lesão macular ou papular causado pela invasão da derme papilar por melanócitos atípicos; E. melanoma avançado com lesão apresentando ulceração e crescimento nodular decorrente de proliferação de melanócitos atípicos envolvendo estruturas mais profundas da derme. Adaptado de Cockerell, 2012.

2.5.5 Genética e epigenética do melanoma

A alta frequência de mutações no melanoma pode estar relacionada às características da biologia do melanócito. O fator hormonal estimulador de α -melanócito (*α -melanocyte stimulating hormone* - α -MSH) e outros peptídeos derivados de proopiomelanocortina se ligam ao receptor de melanocortina 1, ativando o AMP cíclico e levando ao aumento da proliferação e melanogênese em resposta à radiação UVB. Essa cascata de sinalização dependente de AMP cíclico ativa BRAF e ERK que causam a desregulação da proliferação e diferenciação celular (DAVIES et al., 2002).

Levando-se em consideração que a ativação dessas vias de sinalização está diretamente relacionada à proliferação, progressão e manutenção do tumor, elas também tem se tornado importantes alvos terapêuticos. O quadro 3 detalha a função de cada gene e proteínas envolvidas nas vias de sinalização que possivelmente estão alteradas no melanoma (FISHER E., SHTIVELMAN K., T. FLAHERTY, 2014).

Via de sinalização	Componente alterado	Posição cromossômica	Função	Tipo de alteração no melanoma	Frequência	Referências
MAPKK-RAS/RAF/MEK/ERK	<i>MAPK-1</i>	22q11.21	Alterar o comportamento celular frente às mudanças ambientais	Mutação		FISHER E., SHTIVELMAN K., T. FLAHERTY, 2014
	<i>RAS</i>	1p13.2	Família <i>RAS</i> : <i>NRAS</i> , <i>HRAS</i> , <i>KRAS</i> . Ativadoras da família RAF regulam sinais de proliferação, sobrevivência e diferenciação.	Mutação	20%	WITTINGHOFFER; SCHEFFZEK; AHMADIAN, 1997; OMHOLT et al., 2003
	<i>RAF</i>	7q34	Família <i>RAF</i> : <i>ARAF</i> , <i>BRAF</i> , <i>CRAF</i> . Liberam sinais mitogênicos.	Mutação	50-65%	BENNETT, 2008
	<i>MEK1/2</i>	Un	Fosforila resíduos de tirosina e treonina	Mutação	3-8%	NIKOLAEV et al., 2012
	<i>ERK-1/2</i>	1p36.1-p35	Alteram o comportamento celular frente a estímulos extracelulares como a luz UV	Aumento na expressão		FISHER E., SHTIVELMAN K., T. FLAHERTY, 2014
RAS/PI3K/PTEN/AKT/	<i>PI3K</i>	3q26.3	Regula a progressão da fase G1/S, inibe apoptose e aumenta a sobrevida, libera sinais de proliferação e sobrevivência	Mutação		SAMUELS et al., 2004
	<i>PTEN</i>	10q23.3	Atua como supressor tumoral regulando a via PI3K-AKT	Mutação ou deleções	40-60%	FISHER E., SHTIVELMAN K., T. FLAHERTY, 2014
	<i>AKT1/2/3</i>	14q32.32	Modulador da transformação oncogênica,		25%	FISHER E., SHTIVELMAN K., T. FLAHERTY, 2014

Quadro 3 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização MAPKK-RAS/RAF/MEK/ERK e RAS/PI3K/PTEN/AKT no melanoma cutâneo

Via de sinalização	Componente alterado	Posição cromossômica	Função	Tipo de alteração no melanoma	Frequência	Referências
CDKN2A	<i>CDKN2A</i>	9p21	Regulador negativo de <i>TP53</i> e <i>RB</i>	Perda alélica, deleção ou mutação	25-40%	YANG; RAJADURAI; TSAO, 2005; CHIN, 2003 SHERR; ROBERTS, 1999; RÜBBEN et al., 2000 ZHANG; XIONG; YARBROUGH, 1998; DOBROWOLSKI et al., 2002
	p16 ^{INK4A}		Regulação do ciclo celular através de RB na transição G1-S	Metilação gênica		
	p14 ^{ARF}		Estabilizador e regulador de p53 pela ligação à proteína MDM2	Mutação ou modificação pós-transcricional		

Quadro 4 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização CDKN2A no melanoma cutâneo

Via de sinalização	Componente alterado	Posição cromossômica	Função	Tipo de alteração no melanoma	Frequência	Referências
Apoptose	<i>BCL-2</i>	18q21.3	Gene encontrado no linfoma de célula B. codifica a proteína Bcl-2 supressora da apoptose	Aumento da expressão e amplificação	30% (BCL2A1)	FISHER E., SHTIVELMAN K., T. FLAHERTY, 2014
	<i>MDM2/4</i>	12q14.3-q15	<i>Murin double minute 2</i> . Codifica a ubiquitina-ligase E3 localizada no núcleo e interage com proteínas supressoras de tumor tais como o p53.	Amplificação	65%	FISHER E., SHTIVELMAN K., T. FLAHERTY, 2014
	<i>TP53</i>	17p13.1	Codificador da proteína supressora tumoral que atua na passagem da fase G1 para S do ciclo celular	Mutação	10-20%	RAGNARSSON-OLDING et al., 2002

Quadro 5 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização de apoptose no melanoma cutâneo

Via de sinalização	Componente alterado	Posição cromossômica	Função	Tipo de alteração no melanoma	Frequência
Ciclo celular	CDK4	12q14	Controla a passagem pelo ponto de checagem em G1. Pode ser inibido seletivamente pelo p16.	Amplificação e mutação	3%
	MYC	8q24.21	Pode ultrapassar o bloqueio G1 conferido pela p16	Amplificação ou aumento de expressão	20-40%
	MITF	3p14.2-p14.1	Regula genes relacionados ao controle do ciclo celular e melanogênese, media diferenciação e sobrevivência de melanócitos e limita a progressão incontrolada, limita a expressão de p16, p21 e genes antiapoptóticos como <i>BCL-2</i> e <i>APEX-1</i>		

Quadro 6 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização do ciclo celular no melanoma cutâneo. Adaptado de Fisher et al., 2014

Via de sinalização	Componente alterado	Posição cromossômica	Função	Tipo de alteração no melanoma
Melanogênese	POMC	2p23.3	Proopiomelanocortina. Hormônio estimulador de melanócito que é aumentado em resposta à radiação UV	Ativação, aumento no nível de ligantes
	Mc1r	16q24.3	<i>Melanocortin 1 receptor</i> - Receptor 1 de melanocortina. Proteína transmembrana que pertence à família de receptores de proteína G.	Ativação, aumento no nível de ligantes
	α -MSH		<i>α-Melanocyte Stimulating Hormone</i> - Hormônio estimulador de melanócito α . Age no aumento de eumelanina e feomelanina	Ativação, aumento no nível de ligantes
	HGF	7q21.1	<i>Hepatocyte growth fator</i> - Fator de crescimento de hepatócito. Estimula a proliferação e motilidade de melanócitos e quebra a ligação entre melanócitos e queratinócitos pela inativação de E-caderina e desmogleina-1 causando proliferação desreguladas das células no melanoma	Ativação, aumento no nível de ligantes

Quadro 7 – Genes e proteínas envolvidas na via de sinalização da melanogênese no melanoma cutâneo. Adaptado de Fisher et al., 2014

Via de sinalização	Componente alterado	Posição cromossômica	Função	Tipo de alteração no melanoma	Frequência
Telomerase	TERT	5p15.33	Regula o comprimento do telômero e a capacidade replicativa da célula	Mutação	70-80%
Receptores de superfície	<i>KIT</i>	4q12	Proteína que age como receptor de fator de crescimento em melanócitos, sendo importante para diferenciação e migração	Mutação ou amplificação	
	Endotelina 1/3, α -MSH, bFGF, HGF-SF		Fatores de crescimento que estimulam os receptores GPCR e RTK que sinalizam para proliferação, diferenciação e sobrevivência na linhagem de melanócitos	Ativação, aumento no nível de ligantes	
	<i>MET</i>	7q31	Receptor de tirosina quinase que está presente em células epiteliais e melanócitos. Ativa fibroblastos a produzirem HGF	Ativação, aumento no nível de ligantes no estroma	
Metástase	<i>E-caderina</i>	16q22.1	Proteína que controla a proliferação do melanoma. Sua diminuição promove a diminuição da adesão queratinócito-melanócito que leva à invasão para a derme.	Deleção ou perda de função	

Quadro 8 – Genes e proteínas envolvidas nas vias de sinalização da telomerase, receptores de superfície, e metástase no melanoma cutâneo. Adaptado de Fisher et al., 2014

A via do supressor tumoral p53 também ativada em resposta aos danos dos RUV (raios ultravioleta), a fosforilação dessa proteína leva à sua estabilização que promove a transcrição de outros genes responsáveis pela parada da divisão celular na fase G1/S para induzir reparo ou levar à apoptose evitando assim a proliferação e expansão clonal de células anormais. A proteína p53 não é detectada em tecidos normais e tem gradativo aumento ao longo da progressão do melanoma, sendo mais frequente na metástase, o que está relacionada à mutação do gene *TP53*. A frequência de mutação genética varia entre 10-25% no melanoma existindo uma predominância na transição CC-TT. Mutações concomitantes em *TP53* e *p16* associado ao aumento na expressão de p53, deleção de *CDKN2A* e mutação de *BRAF* caracteriza pacientes com baixa sobrevida (ANWAR; NORRIS; FUJITA, 2011; KANOKO et al., 1996; RODOLFO; DANIOTTI; VALLACCHI, 2004).

O silenciamento de genes supressores de tumor pode ocorrer durante o desenvolvimento do melanoma ou em estágios avançados da doença. A inativação epigenética de genes relacionados ao tumor implica no estabelecimento de malignidade e na progressão e metástase. Muitos desses genes estão envolvidos no controle do ciclo celular, sinalização celular, migração e invasão, apoptose, angiogênese e metástase. Do mesmo modo, existem genes que podem estar ativados no melanoma e silenciados nos melanócitos. O aumento na metilação está relacionado não apenas com um mal prognóstico no melanoma, mas também pode ser usado para monitorar o desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos (GREENBERG et al., 2014).

O gene *RAS* é o gene codificador da família de proteínas Ras. A proteína Ras é uma proteína transmembrana ligada a proteína G que possui a função de converter sinais da membrana para o núcleo. Esses sinais químicos levam a síntese de proteínas e a regulação de sobrevivência celular, proliferação e diferenciação. A família Ras inclui as proteínas Ras (H,

K, M, N e R), Rap1 e Rap2, e Ral, que compartilham cerca de 50% de identidade da sequência, e tais proteínas são importantes no câncer pelo fato de uma mutação em *RAS* levar a ativação constitutiva das proteínas Ras resultando na estimulação contínua da proliferação celular (ADJEI, 2001).

Proteínas Raf (*Rapidly growing fibrosarcoma*) constituem uma família de serina-treonina quinases (ARAF, BRAF e CRAF) e são moléculas intermediárias na via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK (figura 8). Essas moléculas enviam sinais extracelulares da membrana celular para o núcleo via cascata de fosforilação. Tais sinais estimulam o crescimento celular, invasão e metástase, evasão da apoptose, sobrevivência celular, diferenciação e senescência, desenvolvimento vascular e angiogênese (SHEPHERD; PUZANOV; SOSMAN, 2010).

Existem mais de cinquenta mutações em *BRAF* descritas, sendo que a mais comum em melanoma é a substituição de valina por ácido glutâmico na posição 599. A aquisição da mutação V600E desestabiliza a conformação da quinase inativa para a forma ativa levando a atividade constitutiva. A identificação de mutações de *BRAF* no melanoma levou ao desenvolvimento de algumas moléculas inibidoras de BRAF quinase que estão em fase pré-clínica e clínica de investigação. Os principais investigados são: SB590885, GSK2118436, PLX4032 (vemurafenib), AZ628, XL281 e GDC-0879. Consistente com o papel da sinalização BRAF/MAPK na regulação do crescimento celular, o tratamento com inibidores farmacológicos de BRAF das linhagens celulares de melanoma, com *BRAF* V600E mutante, leva a parada do ciclo celular na fase G1 e ativação da cascata da apoptose (FEDORENKO; PARAISO; SMALLEY, 2011).

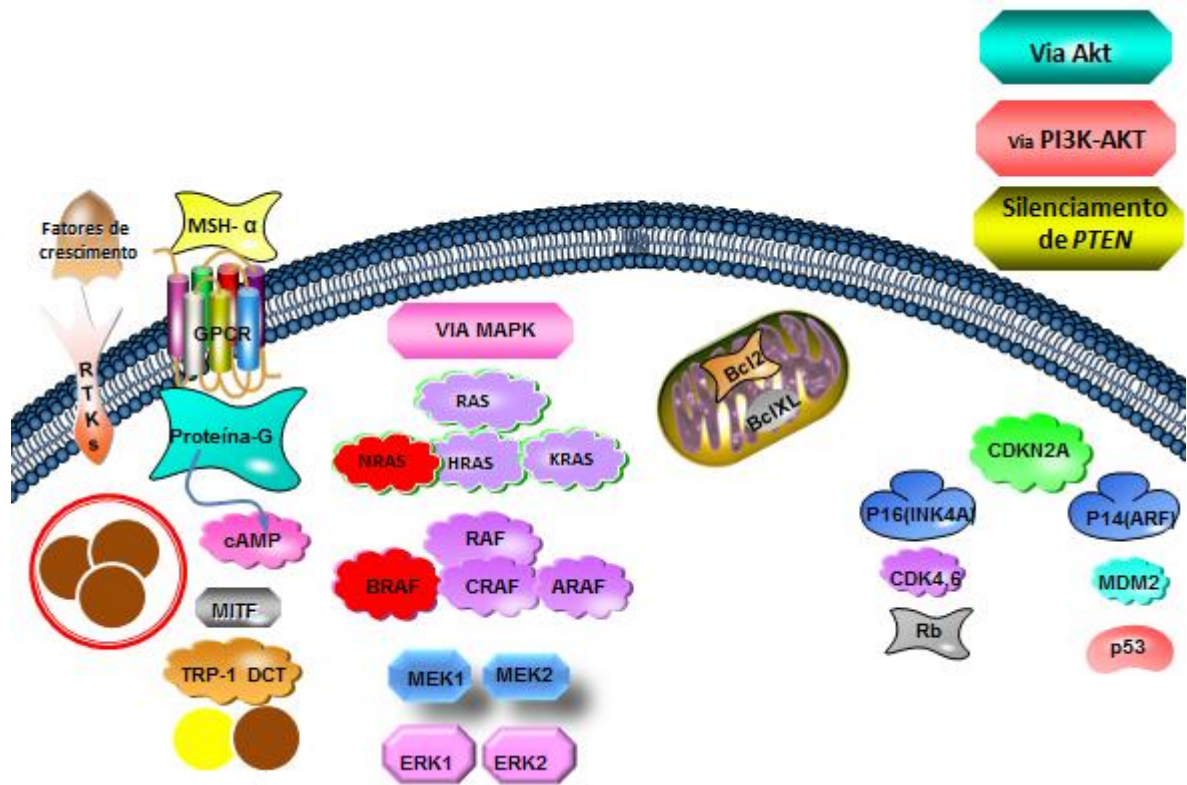


Figura 8 - Lesões genéticas no melanoma. Múltiplas vias de sinalização, perda de supressores tumorais e amplificação de proteínas do ciclo celular são características das células do melanoma. A mutação BRAF V600E é um alvo importante para o desenvolvimento de novos medicamentos (caixa vermelha). Adaptado de SHEPHERD et al., 2010.

Muitos avanços ocorreram decorrentes do surgimento dos inibidores alvo específicos. PLX4032, por exemplo, induz regressão completa ou parcial em 81% do pacientes com melanoma com a mutação BRAF V600E e a resposta é observada em todos os sítios da doença, incluindo ossos, rins e intestino delgado (FLAHERTY; HODI; BASTIAN, 2010).

Apesar do sucesso clínico das terapias-alvo contra as quinases, numerosos desafios têm sido enfrentados. Um deles é a ocorrência de efeitos adversos como fadiga, artralgia e aparecimento de carcinoma de células escamosas de pele em cerca de 30% dos pacientes tratados com inibidores; e a possibilidade de desenvolvimento de resistência adquirida, com o estabelecimento de *feedback* negativo ou ativação de vias alternativas da sinalização RAS-MEK-MAPK, outras mutações ou amplificações de BRAF, mutações em K-RAS, N-RAS, H-RAS, mutações em MEK1, ativação da via PI3K/AKT que causa proliferação descontrolada e

resistência a apoptose, ativação de vias de fuga tais como MET, KIT, FGFR e EGFR (BOLLAG et al., 2010; SHEPHERD; PUZANOV; SOSMAN, 2010).

2.5.6 Diagnóstico

O primeiro passo para o diagnóstico de melanoma é a biópsia que é a remoção de parte da lesão (biópsia incisional) ou lesão inteira (biópsia excisional). Após a biópsia, associa-se os achados laboratoriais, tais como exames de sangue e testes sorológicos (quantificação de LDH – lactato desidrogenase, faz detecção de metástases), a dermoscopia, as informações clínicas (histórico de sinais e sintomas nos principais sistemas biológicos – neurológico, respiratório, hepático, gastrointestinal, musculoesquelético, pele e linfático) e os exames de imagem como tomografia computadorizada, tomografia de emissão (PET-*Positron Emission Tomography*) e SLNB (mapeamento linfático por linfocintilografia com injeção intraoperativa de radioisótopo e corante azul para identificação de metástases para o sistema linfático) posteriormente, observando os critérios de: espessura da lesão, presença de ulceração, taxa de mitose, presença de fase de crescimento vertical, infiltração linfocitária, regressão da derme e invasão angiolinfática pode-se prever o prognóstico do paciente (BICHAKJIAN et al., 2011; GARBE et al., 2012; KARAKOUSIS; CZERNIECKI, 2011).

Associado ao diagnóstico clínico, histopatológico, dermoscópico e bioquímico, o diagnóstico molecular tem sido utilizado, principalmente por já existir inibidores para proteínas de genes mutados. Dentre esses existem a detecção de *BRAF* V600, para eleger pacientes para o tratamento com inibidores de BRAF e MEK, *NRAS* para confirmar a mutação em *BRAF* e *CKIT* para pacientes com melanoma acral ou de mucosa e que podem ser tratados com inibidores de CKIT (GARBE et al., 2012).

2.5.7 Tratamento

Como formas de tratamento para o câncer, o padrão ouro para tumores sólidos continua sendo a cirurgia que pode ser associada à radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e terapia-alvo. Diferente da radioterapia que incide radioisótopos sobre os tumores, a quimioterapia faz uso de fármacos que induzem a morte celular por interferir na estrutura ou em processos vitais para as células (FLAHERTY, 2006).

Os quimioterápicos tradicionalmente utilizados objetivam a inibição da proliferação celular e/ou indução da morte das células neoplásicas por influir diretamente no ciclo celular. São divididos em ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos. Dentre os específicos existem os agentes antimetabólicos (análogo do ácido fólico, antagonistas de pirimidinas, análogos das purinas e inibidores correlatos); agentes hormonais (adrenocorticosteróides, progestinas, estrogênios, antiestrogênio, antiandrogênio, análogo de hormônio liberador de gonadotropina, inibidor de aromatase, inibidor de hormônio peptídico); produtos naturais (alcaloides da vinca, podofilotoxinas, taxol e enzimas). Os agentes ciclo-celular não específicos são divididos em produtos naturais (antibióticos antraciclinas, mitociclinas, dactinomicina, plicamicina, bleomicina e alcaloides pirrolizidínicos), complexos de coordenação de Platina (cisplatina e carboplatina) e agentes alquilantes (mostardas nitrogenadas, nitrossuréias, triazenos, alquil sulfonatos) (ALMEIDA et al., 2005).

Para o tratamento do melanoma primário, a excisão da lesão continua sendo o padrão ouro considerando a margem de segurança indicada para cada peculiaridade dos tumores. A radioterapia também é indicada em alguns casos específicos, como o de metástase em linfonodos, lesão cutânea muito extensa, metástase cerebral ou óssea (DE BRAUD et al., 2003; GARBE et al., 2011).

O melanoma é considerado uma doença resistente à quimioterapia sistêmica em que o paciente torna-se refratário ao longo do tempo tornando o tratamento paliativo. Em suma tem sido utilizado agentes alquilantes tais como Dacarbazina e Termozolomida, nitrosuréias (carmustine, lomustine e fotemustine), compostos de platina (cisplatina e carboplatina); inibidores de microtúbulos tais como o alcaloide da vinca vimblastina e os taxois, paclitaxel e docetaxel (TREISMAN; GARLIE, 2010).

A Dacarbazina é o medicamento padrão utilizado para o tratamento sistêmico melanomas malignos, objetivando a regressão do tumor e diminuição dos sintomas relacionados. Dacarbazina - 5-(3,3-dimetiltraiazeno)imidazol-4-carboxamida é um derivado imidazol-carboxamida estruturalmente relacionado a purinas, é uma pró droga cujo mecanismo de ação não é ciclo celular específico, sendo ativo durante todo o ciclo celular. Sua ação antitumoral está relacionada a produção de adutos de metil no DNA através da produção de íons metildiazonium que reagem com as bases purínicas causando o pareamento incorreto das bases e, conseqüentemente, distorção na dupla hélice do DNA (MARCHESI et al., 2007). Recentemente, demonstrou-se o efeito imunoestimulatório da Dacarbazina pela indução da ativação local de células *natural killer* e linfócitos T sugerindo uma iniciação de resposta imune tumoral (GRIEWANK et al., 2013).

A termozolomida é uma imidazoletetrazina que possui a mesma ação alquilante da Dacarbazina com as vantagens de se ativar em pH fisiológico normal, possuir 100% de biodisponibilidade, distribuição extensa pelos tecidos, ser de administração oral e ter uma taxa de resposta completa de 8% (Dacarbazina é de 4%) (PATEL et al., 2011).

Uma alternativa promissora que tem sido investigada é a terapia-alvo. Por meio dela, objetiva-se atingir uma proteína ou gene específico de forma a obter uma terapia mais efetiva. As principais vias de sinalização envolvidas são MAPK, AKT, ERK e PI3K. O bloqueio

simultâneo das vias ERK-MAPK e PI3K seria a terapia ideal por inibirem tanto a progressão celular quanto induzirem a apoptose (TREISMAN; GARLIE, 2010).

O gene *BRAF* é um importante alvo terapêutico por estimular proliferação, sobrevivência e manutenção dos tecidos neoplásicos. Partindo dessa idéia, a primeira geração de inibidores específicos de *BRAF* V600: GDC 0879, PLX 4720, sorafenib BAY 43-9600 foi criada, não obtendo sucesso na fase clínica III, mas servindo para o lançamento da 2ª geração PLX-4032 que ainda está em fase II dos testes (WELLBROCK; HURLSTONE, 2010).

Outros inibidores seletivos como o Dabrafenib (inibidor de *BRAF*) e Trametinib (inibidor *MEK*) tem mudado o manejo de melanomas de fase III e IV diminuindo a progressão do tumor e aumentando a expectativa de vida dos pacientes (FLAHERTY, 2006; GARBE et al., 2011). Alvos em proteínas anti-apoptóticas BCL-2 (expressar em 90% dos melanomas) como o medicamento Oblimersen e Genasense estão em testes clínicos e são capazes de diminuir a expressão de BCL-2 intensificando a citotoxicidade de quimioterápicos como a Dacarbazina aumentando sua taxa de resposta e sobrevida dos pacientes (GREMEL et al., 2009). Outros estudos tem mostrado moléculas pleiotrópicas, que agem em múltiplas funções celulares, como inibidores de proteossomo indutores de apoptose e, moléculas inibidoras de c-Kit que vem sendo efetivas em melanomas incomuns de mucosa e acral (MARTÍ; SOROLLA; YERAMIAN, 2012).

A bioquimioterapia também vem sendo usada como terapia adjuvante que agrega um fármaco imunoadjuvante à um quimioterápico para aumentar o tempo de remissão. Alternativas como Interferon- α e Interleucina-2. As evidências atuais mostram que o IFN- α não confere vantagem significativa na sobrevida, porém produz importante melhora na taxa de recorrência e no tempo livre da doença (PETRELLA et al., 2012). Apesar de já ser aprovada nos Estados Unidos e da Europa, a IL-2 também não tem trazido melhoras nas

respostas clínicas dos pacientes além de ter comprovada toxicidade nos sistemas gastrointestinal, cardiovascular, pulmonar, renal, hepático e neurológico o que convém acrescentar que os pacientes que recebem essas terapias devem ser bem acompanhados e a seleção do paciente para o uso dos mesmos deve ser bem analisada (HAMM et al., 2008; PETRELLA et al., 2012).

Outro alvo imunológico que tem sido estudado são inibidores da proteína CTLA-4. Sua função na célula normal é competir pela ligação aos receptores das células apresentadoras de antígenos diminuindo o reconhecimento de moléculas estranhas pelos linfócitos T. Os fármacos Tremelimumab e Ipilimumab são anticorpos monoclonais anti-CTLA-2 que estimulam o reconhecimento das células neoplásicas pelo sistema imune (O'DAY; HAMID; URBA, 2007). Por outro lado também tem sido desenvolvidas moléculas indutoras de estresse oxidativo como o Elesclomol e os inibidores de angiogênese por inibição de VEGF (fator de crescimento epidérmico e vascular), Bevacizumab (MARTÍ; SOROLLA; YERAMIAN, 2012; O'DAY; HAMID; URBA, 2007).

Concomitante à busca molecular de alternativas terapêuticas, o século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas e microrganismos (bactérias, fungos, actinomicetos, organismos marinhos) no campo da oncologia propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica. Apesar da alta complexidade química, a maioria dos fármacos anticâncer introduzida na terapêutica nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais. No período de janeiro de 1981 a dezembro de 2010, cerca de 128 novos medicamentos contra o câncer foram criados a partir de produtos naturais (HARVEY, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2007, 2012).

2.6 Biflorina

Produtos naturais ou também chamados compostos bioativos puros possuem um papel dominante nas descobertas que levam ao desenvolvimento de medicamentos para o tratamento das doenças humanas. Entre 2006 e 2010, metade das substâncias aprovadas como antitumorais, antibacterianas e antifúngicas eram de origem natural ou derivadas diretamente dela (NEWMAN; CRAGG, 2012). Produtos naturais tem inspirado o desenvolvimento da química orgânica, levando a avanços nas metodologias de síntese e possibilitando a produção de análogos do composto original para o melhoramento de propriedades farmacêuticas e farmacológicas. As fontes podem ser variadas, desde espécies vegetais até actinomicetos marinhos e cianobactérias, e tem crescido principalmente o interesse na pesquisa sistemática de moléculas inibidoras de processos bioquímicos de interesse que levam a mudanças fenotípicas devido a alterações na expressão gênica ou na função de proteínas (HARVEY, 2008). Exemplos clássicos são os agentes quimioterápicos alcaloides da vinca, taxanos e camptotecinas e os exemplos mais atuais são inibidores de proteína quinase tais como o Gleevec, aprovado pela FDA em 2001, e o Sorafenib, aprovado em 2005 (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

A *Capraria biflora* L. (figura 9) é uma espécie de arbusto perene pertencente à família Schrophulariaceae, originária das Antilhas e América do Sul, que habita zonas temperadas e áreas de clima tropical. A espécie é amplamente distribuída pelo continente americano. Na América do Sul é encontrada em países como Venezuela, Peru, Guiana Francesa e Brasil. No Brasil está presente nos estados de Goiás, Minas Gerais e na faixa litorânea entre o Piauí, até o Espírito Santo. Na América Central pode ser encontrada em El Salvador, Trinidad-Tobago, Bahamas, Panamá, Curaçao, Guatemala e Porto Rico; na América do Norte: Estados Unidos e México, na Ásia: Índia e China. No continente Europeu é muito usada como ornamento (CORREA, 1931; MATOS, 1988).



Figura 9 - *Capraria biflora*. A) folhas e flor; B) raízes. Fonte: Vasconcellos et al., 2007.

A planta *C. biflora* é usada popularmente contra dor de estômago, dispepsia, febre, resfriado, vômito, diarreia, hemorróida, reumatismo, dentre outros (AQUINO; LIMA, 2006). Gonçalves de Lima e colaboradores em 1953 foram os responsáveis por realizar os primeiros trabalhos fitoquímicos com a *Capraria biflora*, sendo inicialmente isolada a substância biflorina. Quimicamente, a biflorina (figura 10) é uma o-naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-pran-7,8-diona) prenilada de origem natural que pode ser facilmente obtida das raízes da *C. biflora* L., os dados de RMN de ^{13}C foram registrados pela primeira vez por Fonseca e colaboradores (2002) (GONÇALVES DE LIMA et al., 1953; FONSECA et al., 2002).

Dentre as atividades comprovadas, a biflorina possui ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e álcool-ácido-resistentes (FONSECA et al., 2003), citotóxica, analgésica e anti-inflamatória (ACOSTA et al., 2003; NASCIMENTO; MÉLLO; CHIAPPETA, 1985). Recentemente constatou-se a atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti* utilizando o óleo essencial e o hidrolato de *C. biflora* com concentração letal 50 de 73,39 ($\pm 2,27$ $\mu\text{g/mL}$) (DE SOUZA et al., 2012).

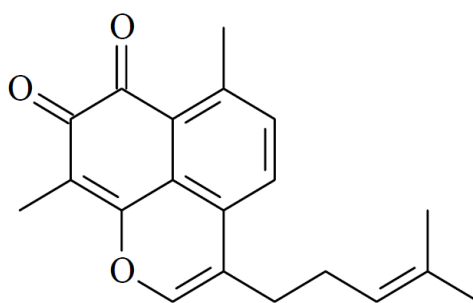


Figura 10 – Estrutura molecular da biflorina, uma *o*-naftoquinona (6,9-dimetil-3-(4-metil-3-pentenil)nafta[1,8-*bc*]-pran-7,8-diona) prenilada

A atividade antitumoral da biflorina foi primeiramente estudada por Vasconcellos e colaboradores (2005). A citotoxicidade *in vitro* da biflorina apresenta-se de forma inespecífica agindo sobre diversas linhagens: melanoma murinho (B16), melanoma humano (UACC-62, UACC-257, MDA-MB-435, M14), leucemia humana (CEM, HL-60, K562), carcinoma e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7, MDA-MB-231, MX1), carcinoma e adenocarcinoma de pulmão humano (NCI H266, NCI H23), carcinoma de próstata (PC-3), glioblastoma (SF-295), cólon (HCT-8) e sistema nervoso central (VASCONCELLOS et al., 2005, 2011).

Após a avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares, foi demonstrado que a Biflorina não causa lise de membrana eritrocitária de camundongo, possui ação antioxidante na auto oxidação do ácido oleico (VASCONCELLOS et al., 2005), e contra radicais hidroxila (VASCONCELLOS et al., 2010) induzindo proteção contra danos oxidativos. Adicionalmente, a Biflorina também possui atividade imunoestimulante *in vivo*, aumentando a concentração de anticorpos no soro de animais (VASCONCELLOS et al., 2007).

A atividade anti-tumoral *in vivo* foi realizada em modelo murinho de carcinoma de Erlich e Sarcoma 180 (VASCONCELLOS et al., 2007) e de melanoma murino B16 (VASCONCELLOS et al., 2011), em que foi possível observar a diminuição do volume e do peso da massa tumoral e, em análise histológica e de imunohistoquímica visualizou-se

redução na necrose coagulativa e na proliferação celular associado ao aumento no tempo de sobrevida do camundongo (VASCONCELLOS et al., 2011, 2007). Recentemente, Andrade e colaboradores (2013) demonstrou que a biflorina foi capaz de reduzir até 71% o número de metástases pulmonares de melanoma murinho e aumentou também a sobrevida dos camundongos (ANDRADE et al., 2013).

Aliado a isso, a associação da biflorina com o quimioterápico 5-fluoracil em camundongos com sarcoma 180 e carcinoma de Erlich causou aumento na resposta antitumoral, significativamente em relação ao controle negativo e aos tratamentos com as substâncias separadas, e aumentou a sobrevida dos animais (VASCONCELLOS et al., 2007). O sinergismo entre um quimioterápico padrão e a química dos produtos naturais possui um importante potencial para a melhora das propriedades biológicas e farmacocinéticas do composto bioativo (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014).

O mecanismo de ação da biflorina continua desconhecido, porém já se conhece sua importante interação com o DNA, devido a sua genotoxicidade em células V79 (VASCONCELLOS et al., 2010) e, diminuição na síntese de DNA, além de induzir morte celular por apoptose associado a fragmentação internucleossomal no DNA e despolarização mitocondrial em linhagem de melanoma murinho B16 que podem sugerir mecanismo de morte por dano direto ao DNA (VASCONCELLOS et al., 2011).

Aliada à atividade anti-tumoral significativa, a biflorina não parece ser teratogênica, pois não inibe o desenvolvimento de embriões de ouriço do mar (VASCONCELLOS et al., 2005) e nem induz mutagenicidade em diferentes modelos biológicos, tais como bactérias *Salmonella typhimurium* e fungos *Saccharomyces cerevisiae*, sendo assim, a biflorina não causa mutação locus não-específica, nem locus específica e nem *frameshift* (VASCONCELLOS et al., 2010).

Associado a esses resultados, a biflorina também possui atividade anti-clonogênica, inibidora de migração celular, redutora da amplificação de *MYC* e tem indicativo de inibir a atividade da telomerase *in vitro* em células de adenocarcinoma gástrico (BARBOSA, 2011); é capaz de diminuir a expressão de EGFR em células neoplásicas de mama SK-Br3 (MONTENEGRO et al., 2013a) e a expressão de N-caderina via inibição da expressão de *AKT1* de forma concentração dependente, levando a inibição da invasão em células de melanoma MDA-MB-435 (MONTENEGRO et al., 2013b); e diminui a adesão, a migração e a invasão de células de melanoma murino B16F10 (ANDRADE et al., 2013).

Esse trabalho se propõe a avaliar o potencial citotóxico da biflorina em linhagens de melanoma humano com características genéticas distintas e verificar alterações em genes envolvidos nos mecanismos de progressão do ciclo celular, replicação do DNA, reparo celular e na metilação do DNA dessas células.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial citotóxico da biflorina em linhagens de melanoma humano e alterações nos genes envolvidos nos mecanismos de progressão do ciclo celular, replicação do DNA, reparo celular e na metilação do DNA dessas células.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade da biflorina em linhagens de melanoma humano;
- Determinar o mecanismo de morte celular causado pela biflorina em linhagens de melanoma humano;
- Avaliar a genotoxicidade da biflorina em linhagens de melanoma humano;
- Avaliar a alteração na expressão gênica nas linhagens de melanoma humano após tratamento com biflorina, especificamente, do oncogene *BRAF*; gene *MELK*, envolvido na progressão do ciclo celular; *TYMS*, envolvido na replicação do DNA; *RAD* e *MGMT*, envolvidos no reparo ao DNA; *DNMT1*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4* e *MeCP2* envolvidos nos mecanismos de metilação do DNA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Estudo transversal utilizando modelos experimentais *in vitro*.

4.2 Obtenção da biflorina

A biflorina foi cedida pela professora Telma Leda Gomes de Lemos da Universidade Federal do Ceará – Departamento de química orgânica e inorgânica. A biflorina foi extraída das raízes da *Capraria biflora* utilizando o solvente éter de petróleo seguido da secagem por *air-dried* por 2 dias. O extrato foi parcialmente evaporado a temperatura ambiente até a formação de um material sólido. Posteriormente, foi filtrado até ser obtido um pó púrpura. O pó foi submetido a cromatografia em sílica gel usando uma mistura binária éter de petróleo-acetato de etila 9:1 (v/v). A pureza e a estrutura (figura 10) foram confirmadas por análise espectroscópica, incluindo ressonância magnética nuclear de uma e de duas dimensões, infravermelho, propriedades físicas e comparação com as informações da literatura (FONSECA et al., 2003). Devido a sua baixa hidrossolubilidade, a biflorina é geralmente diluída em DMSO.

4.3 Linhagens celulares

Foram utilizadas as linhagens de melanoma humano metastático SK-Mel-19, SK-Mel-28 e SK-Mel-103 gentilmente doadas pela Profa. Dra. Sylvia Maria Stuch-Engler da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP.

O modelo de estudo com as três linhagens celulares proporcionou a comparação do efeito da droga teste em diferentes mutações em melanomas humanos, como mostrado no quadro 10 (SANTOS, 2011).

Linhagem				
Componente alterado	SK-Mel 19	SK-Mel 28	SK-Mel 103	Referência
TP53	Wt	R273H	Wt	SANTOS, 2011
p53 induzido	+	-	+	SANTOS, 2011
p14 (RNAm)	+	ND	+	SANTOS, 2011
p16 (RNAm)	+	+	+	SANTOS, 2011
Apaf-1 (prot)	++	-/+	-	SANTOS, 2011
Casp8 (prot)	++	++	+	SANTOS, 2011
Bcl-2 (prot)	+++	++	++	SANTOS, 2011
Bcl-xL (prot)	++	++	+++	SANTOS, 2011
Mcl-1 (prot)	ND	++	+++	SANTOS, 2011
B-RAF (V⁵⁹⁹E)	V600E	V600E	Wt	XING et al., 2012
N-RAS (éxon 3)	Wt	Wt	Q61R	XING et al., 2012
PTEN	wt	R130Q, T167A	NA	XING et al., 2012
RB1	wt	wt	NA	XING et al., 2012
CDKN2A	P113, R58	wt	NA	XING et al., 2012

Quadro 9 - Características genéticas das linhagens utilizadas. Wt - wild-type (tipo selvagem); mRNA – RNA mensageiro; prot - proteína; Q61R - mutação no códon 61, presente no éxon 3, ocasionada pela substituição de adenina por guanina no nucleotídeo 182, que resulta na substituição de guanina por arginina; p53 R273H: mutação hot spot da proteína, resultando na substituição de arginina por histidina no códon 273; V600E - substituição de valina por ácido glutâmico na posição 599; ND – não detectado. NA – informação não disponível. Fonte: adaptado de M. Santos, 2011.

As linhagens foram mantidas em garrafas de cultura com meio de cultura *Dulbecco's Modified Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico Ampicilina-Estreptomicina, condicionadas em estufa com 5% de CO₂ e a 37° C. Foi feita a observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão (Leica Microsystems) a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram replicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5 – 1,0 x 10⁶ células por mililitro.

4.4 Avaliação da citotoxicidade

4.4.1 Ensaio Alamar Blue

O teste *in vitro* ideal para a quantificação da proliferação celular ou citotoxicidade é simples, rápido, eficiente, reprodutivo, sensível, seguro, de baixo custo e que não interfira na ação do composto a ser testado. O Alamar Blue, no entanto, é um reagente estável e não tóxico que monitora a atividade metabólica das células. Sua ação consiste num indicador de

óxido-redução que leva a uma mudança colorimétrica e de intensidade de fluorescência em resposta a atividade metabólica celular, sendo que a fluorescência é 10 vezes mais sensível a proliferação que a coloração. A proliferação celular caracterizada pelo aumento no consumo de oxigênio induz a redução química do meio o que resulta na mudança da cor original azul não fluorescente para rosa fluorescente. A intensidade da cor rosa reflete proporcionalmente a proliferação celular. Resazurina é o nome original do Alamar Blue e a redução da resazurina a resorufina é o que baseia o mecanismo de ação desse método de quantificação da proliferação de células vivas (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994; O'BRIEN et al., 2000).

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed e colaboradores (1994). As células foram transferidas para placas com 96 cavidades na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço. Essa placa foi então mantida durante 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas com diluições seriadas 1:2 v/v de biflorina a partir da concentração de 20 µM à 0,3125 µM e em diferentes intervalos de tempo de tratamento: 24,48 e 72 horas. A Dacarbazina e a Doxorubicina foram utilizadas como controle positivo. Os poços controle receberam DMSO (diluyente da amostra) 0,1%. Quatro horas antes do final de cada tempo de tratamento foi acrescentado 10 µL do Alamar Blue na concentração de 0,02% e foi realizada a leitura das placas em Leitor de microplaca na região da fluorescência nos comprimentos de onda em 465 nm e 540 nm (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994).

Foram realizados três experimentos em triplicata e os dados foram analisados no programa GraphPad prism 5.0 usando regressão não linear para a determinação da CI50 (concentração inibitória de 50% da viabilidade celular) considerando o intervalo de confiança de 95%.

4.4.2 Teste de exclusão por Azul de Tripan

O ensaio de exclusão por azul de tripan é utilizado para a determinação da viabilidade celular presente em uma suspensão celular tendo como base que as células metabolicamente ativas possuem membrana celular intacta e a capacidade de expulsar o corante, ao contrário das células inviáveis. Nesse ensaio, as células em suspensão são misturadas ao corante e visualizadas ao microscópio para serem diferenciadas em viáveis (não coradas) e inviáveis (coradas de azul) (STROBER, 2001).

O teste de Exclusão do Azul de Tripan foi realizado de acordo com Strober (2001). As células foram colocadas em placas de 24 poços na concentração de $3,0 \times 10^4$ células por poço e incubadas em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24h. Após esse período, as células receberam o tratamento com biflorina nas concentrações de 1,0 µM, 2,5 µM e 5,0 µM.

A Dacarbazina e a Doxorrubicina a 5,0 µM foram utilizadas como controle positivo e o DMSO como controle negativo. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, as células foram colhidas e centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o concentrado de células foi ressuspenso com 1000 µL de meio DMEM completo. Deste foram retirados 90 µL aos quais foram adicionados 10µL de Tripan Blue. Decorridos 2 minutos, 10µL da suspensão de células coradas foi aplicado em uma câmara de Neubauer e foram contadas as células viáveis e as não-viáveis. Foram realizados três experimentos em triplicata e os resultados foram analisados por ANOVA *two-way* seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos $*p < 0,05$ comparando com o controle negativo.

4.5 Avaliação da morfologia celular

4.5.1 Coloração por cristal violeta

O cristal violeta pertence à classe dos triarilmetanos e apresenta amplas aplicações comerciais, tecnológicas e médicas. Apresenta coeficiente de partição baixo (2,4), porém tem apropriado caráter hidrofílico e lipofílico para garantir uma eficiente permeação em membranas celulares possibilitando a coloração de células (OLIVEIRA et al., 2011).

As células foram cultivadas em placas para microcultivo com 6 poços, sendo colocado em cada poço o equivalente a 2×10^5 células. Após a confluência, as células foram tratadas com biflorina nas concentrações 1,0 μM , 2,5 μM e 5,0 μM e foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Após 24h, as células foram lavadas com tampão com sais de fosfato (PBS), e, posteriormente, foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Passados 30 minutos, as células foram lavadas três vezes com água destilada e, em seguida, a solução de cristal violeta a 0,1% foi adicionada em cada poço da placa seguido de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Então, os poços foram lavados com água destilada para remover o excesso de corante para depois secar à temperatura ambiente. Por fim fotografou-se a placa por inteiro e cada poço individualmente. Foram realizados 3 experimentos independentes para cada linhagem.

4.6 Mecanismo de morte celular

4.6.1 Coloração diferencial Laranja de acridina- Brometo de Etídio

A morte celular é uma estratégia essencial para o controle do equilíbrio do sistema vivo. Pode resultar de processos patológicos sendo iniciada após a percepção de estímulos específicos que levam a mudanças em cascatas intracelulares. O processo de morte pode ser

reversível até que ocorra ativação massiva de caspases, perda do potencial transmembrana da mitocôndria, permeabilização completa da membrana mitocondrial externa ou exposição de resíduos de fosfatidilserina. Sendo assim, uma célula pode ser considerada morta quando um dos seguintes critérios são encontrados: perda de integridade de membrana, fragmentação da célula e/ou do núcleo em pequenos corpos (corpos apoptóticos), incorporação dos restos celulares em células vizinhas (KROEMER et al., 2005).

Como forma de diferenciar os tipos de morte celular apoptose e necrose das células de melanoma tratadas com biflorina, foi utilizado o método de coloração diferencial com laranja de acridina – brometo de etídio. Para tal, as células foram cultivadas em placas de 24 poços e tratadas com biflorina a 1,0 μM , 2,5 μM e 5,0 μM , e, adicionalmente usou-se dacarbazina e doxorubicina a 5,0 μM como controles positivos e DMSO como controle negativo. Decorridos 24h, 48h e 72h de tratamento, coletaram-se o sobrenadante e as células aderidas obtendo-se uma suspensão celular. Esta suspensão de células foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e o concentrado celular foi misturado com 1 μL da mistura de laranja de acridina e brometo de etídio a 100 $\mu\text{g/mL}$. Após coradas, 25 μL foram transferidas para uma lâmina e cobertas com lamínula para que as células fossem observadas em microscópio de fluorescência no aumento de 400x sob filtro de excitação de 360 nm.

A detecção do tipo de morte celular foi baseada nas características morfológicas e da fluorescência das células coradas. Células viáveis foram identificadas por citoplasma e núcleo verdes, células apoptóticas por núcleo vermelho/laranja e citoplasma verde, e células necróticas por núcleo e citoplasma vermelhos. A quantificação foi feita pela contagem de trezentas células em de cinco a dez campos diferentes da lâmina. Foram realizados três experimentos em triplicata e os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de

Bonferroni *posttests* utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$, frente ao controle negativo.

4.7 Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa

4.7.1 Ensaio de eletroforese em gel de célula única em pH alcalino

A eletroforese em gel de célula única (teste do cometa) é uma técnica simples e sensível que permite a detecção das quebras na fita de DNA. Células com quebras na fita de DNA produzem fragmentos que migram em um campo elétrico e, quando coradas, aparecem com o formato de um cometa e o comprimento da calda do cometa representa a extensão do dano ao DNA. Este teste e suas modificações possuem diversas aplicações tais como verificação da genotoxicidade de novos compostos químicos e farmacêuticos, biomonitoramento ambiental e monitoramento de populações humanas (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; TICE et al., 2000).

O ensaio de eletroforese em gel de célula única em pH alcalino foi feito conforme metodologia descrita por Singh (1988) modificada. As células foram contadas em câmara de Neubauer e 2×10^5 células foram colocadas em placas de 6 poços com 2 mL de meio DMEM completo. A placa foi incubada em atmosfera de 5 % de CO_2 a 37°C por 24 h. Após esse período, as células foram tratadas com biflorina nas concentrações de 1,0 μM , 2,5 μM e 5,0 μM durante 3 h. Foram utilizados DMSO como controle negativo, Doxorubicina e Dacarbazina a 5,0 μM como controles positivos. Após as 3 horas de tratamento, obteve-se o concentrado celular o qual foi misturado com agarose de baixo ponto de fusão (LMP) a 1% e colocado sobre uma lâmina de microscopia pré-cobertas com agarose com ponto de fusão normal (NMP). Após a solidificação, as lâminas ficaram em uma solução de lise (EDTA 100mM, NaCl 2,5 M, Tris 10 mM, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO) em *over night*, para que ocorresse a desnaturação da parede celular e nuclear, restando o DNA ocupando o espaço

que antes seria o núcleo da célula, agora chamado nucleóide. As lâminas foram removidas da solução de lise e dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese a qual foi preenchida com solução de eletroforese (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH>13) por 20 minutos para permitir o desempacotamento do DNA. Passados 20 minutos, a eletroforese foi conduzida na ausência de luz por 20 min, a 20 V e 300 mA (N. P. SINGH, M. T. MCCOY, R. R. TICE, 1988).

4.7.2 Ensaio de eletroforese em gel de célula única em pH neutro

O ensaio de eletroforese em gel de célula única em pH neutro foi realizado conforme metodologia descrita por Wojewodzka e colaboradores (2002). Os procedimentos de tratamento das células, preparação da lâmina e lise foram iguais ao cometa alcalino. Porém, para o cometa neutro a solução de eletroforese é preparada com acetado de sódio a 300 mM e 100 mM Tris-HCl, no pH 8,5 e a corrida foi conduzida na ausência de luz por 20 min, a 25 V ou corrente de 300 mA (WOJEWÓDZKA; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2002).

Tanto no cometa alcalino quanto no neutro, após eletroforese, as lâminas foram retiradas da solução de eletroforese e submetidas a lavagem de 15 min com solução de neutralização Tris 0,4 M com pH 7,5. Em seguida, as lâminas foram fixadas em etanol P.A e secas a temperatura ambiente. Posteriormente, a leitura foi realizada em microscópio de fluorescência, aumento de 400x, adicionando-se quarenta microlitros da solução de Brometo de Etídio (20 µg/mL) sobre as lâminas cobrindo-as com lamínula. Utilizou-se filtro de fluorescência no comprimento de onda de 510 nm a 560 nm.

Para cada amostra foram preparadas duas lâminas, sendo contados 50 cometas por lâmina. Os mesmos foram classificados de acordo com a quantidade de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de fragmentação do DNA. A análise dos cometas foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho da cauda e do nucleóide.

O ensaio do cometa, tanto alcalino quanto neutro, foi realizado três vezes em cada linhagem, em duplicata. Para a quantificação do dano foram feitos dois cálculos: índice de dano e frequência de dano, conforme exemplificação nas fórmulas abaixo:

$$\begin{aligned} \text{Índice de dano}_{\text{grau 0}} &= 0 \times \text{número de cometas grau 0} \\ \text{Frequência de dano}_{\text{grau 0}} &= 100 - (50 - n^{\circ} \text{ de cometas grau 0}) \times 100/50 \end{aligned}$$

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Para o índice de dano usou-se ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey (Multiple Comparison Test). Para a frequência de dano usou-se ANOVA *2way* seguido de Bonferroni *posttest*. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$.

4.7.3 Ensaio de eletroforese em gel de célula única modificado para detecção de sítios de metilação no DNA

A diferença de sensibilidade à metilação do DNA da endonuclease de restrição HpaII foi usada no cometa modificado considerando-se que: alto nível de metilação dos dinucleotídeos CpG resultam em aumento na quantidade de DNA na calda do cometa nos nucleóides digeridos com HpaII. Teoricamente a porcentagem de cauda do DNA no caso do tratamento com HpaII representa todos os sítios de CCGG metilados no DNA das células. O dano ao DNA prioritário ao tratamento enzimático representa a quantidade de DNA metilado na amostra digerida (WENTZEL et al., 2010).

O teste do cometa modificado foi executado sob condições alcalinas conforme descrito em J. F. Wentzel e colaboradores (2010). As células foram tratadas com DMSO, biflorina 1,0, 2,5 e 5,0 μM e com 5-AZA 10 μM por 24 horas a 37°C, sendo o DMSO e a 5-AZA o controle negativo e controle positivo, respectivamente. Uma alíquota de 50 μL de concentrado celular foi homogeneizado com 100 μL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% seguido pela aplicação dessa suspensão em uma lâmina pré-coberta com agarose ponto de

fusão normal a 1%. As lâminas foram deixadas a temperatura ambiente para solidificar. As lâminas foram então submergidas em solução de lise contendo 5 M de NaCl, 0,4 M de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 10% de dimetil sulfoxido e 1% de Triton X-100 a 4° C por 16 horas para preparar os nucleóides. Para assegurar as condições favoráveis a digestão enzimática, as lâminas foram postas em contato com tampão 10 mM Tris-HCl, 10 mM de NaCl, 1 mM de mercaptoetanol e 2 mM de EDTA por 10 minutos. A cada lâmina foi então adicionado 100 µL da enzima HpaII a 1,5 U/100 µL e coberta com lamínula, seguido de incubação em câmara úmida a 37° C por uma hora. Após a incubação e remoção das lamínulas, as lâminas foram colocadas na cuba de eletroforese e cobertas com a solução de eletroforese (5M NaOH e 0,4 M EDTA). A corrida eletroforética ocorreu a 30 V e 300 mA por 45 minutos a 4° C, após o qual as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl) com pH 7,5 por 15 minutos. Finalmente, os nucleóides foram corados com brometo de etídio (10µg/mL) e lidos em microscópio de fluorescência.

Foram contados 100 cometas por lâmina, sendo classificados de acordo com a quantidade de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA. A análise dos cometas foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda.

O ensaio do cometa modificado foi realizado três vezes em cada linhagem, em duplicata. A análise estatística dos resultados foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0. Para o índice de dano usou-se ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey (Multiple Comparison Test). Consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$. Os resultados foram expressos como índice de dano e calculados usando o seguinte cálculo:

$$\text{Índice de dano}_{\text{grau 0}} = 0 \times \text{número de cometas grau 0}$$

4.8 Análise da expressão de genes por RT-PCR

PCR Tempo Real (*Real Time Polymerase Chain Reaction* – RT-PCR) é um método que amplifica uma sequência alvo-específica em uma amostra de DNA complementar (cDNA), seguido do monitoramento do processo de amplificação usando sondas que emitem fluorescência. Dentre as diversas sondas existentes comercialmente, a sonda TaqMan, sonda de identificação interna não extensível, sofre clivagem pela enzima *Taq* Polimerase (*Thermus aquaticus*) durante a fase de extensão do PCR. Na degradação da sonda pela *Taq* polimerase, as marcações repórter e de terminação são separadas resultando no aumento da emissão da fluorescência, que é detectado em tempo real durante o curso da reação sendo uma consequência direta da amplificação do gene alvo durante a PCR (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996; GINZINGER, 2002; GIULIETTI et al., 2001; VALASEK; REPA, 2005; WONG; MEDRANO, 2005).

As células das linhagens de melanoma foram transferidas para placas de petri de poliestireno tamanho 60x16 mm, com área de crescimento de 22,1 cm² sendo 1x10⁶ células. Após obtenção de aproximadamente 90% de confluência, as células foram tratadas com biflorina nas concentrações de 1,0 µM, 2,5 µM e 5,0 µM por 24h. Finalizado o período de tratamento, as células foram coletadas para obtenção do concentrado celular. Posteriormente foi extraído o RNA como o reagente Qiazol (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA obtido foi homogeneizado em 30-50 µL de água livre de RNase e foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 8000 (Thermo scientific).

A conversão de RNA das linhagens celulares para DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o *High-Capacity® cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies®) em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Life Technologies®), seguindo as instruções do fabricante.

Para quantificação relativa da expressão dos genes foram utilizados ensaios já validados com sonda de hidrólise *TaqMan*[®] e fluorescência FAM[™] MGB (*Life Technologies*[®]) em termociclador *7500 Fast* (*Life Technologies*[®]). Cada reação de qRT-PCR foi realizada em triplicata técnica e constituiu um volume final de 12 µL, contendo 5,4 µL de cDNA (com aproximadamente 20 ng), 6,0 µL de *Master Mix TaqMan Fast* (*Qiagen*[®]) e 0,6 µL de ensaio com sonda de hidrólise *TaqMan*[®] (*Life Technologies*[®]). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial por 10 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg, anelamento e extensão a 60 °C por 60 seg.

Para normalização dos níveis de expressão desses genes, foi utilizado o gene de referência *B2M*, como determinado previamente (WISNIESKI et al., 2013). O quadro 11 demonstra os ensaios com sonda de hidrólise *TaqMan*[®] adquiridos comercialmente para os genes estudados.

	Gene	Ensaio <i>Taqman</i>
Gene de referência	<i>B2M</i>	Hs00984230_m1
Genes alvos	<i>BRAF</i>	Hs00269944_m1
	<i>DNMT1</i>	Hs00154749_m1
	<i>DNMT3B</i>	Hs00171879_m1
	<i>MBD1</i>	Hs00242770_m1
	<i>MBD2</i>	Hs00187506_m1
	<i>MBD3</i>	Hs00172710_m1
	<i>MBD4</i>	Hs00187498_m1
	<i>MeCP2</i>	Hs00172845_m1
	<i>MELK</i>	Hs01106440_m1
	<i>MGMT</i>	Hs00172470_m1
	<i>RAD54L</i>	Hs00269177_m1
	<i>TYMS</i>	Hs00426586_m1

Quadro 10 - Ensaios com sonda de hidrólise *TaqMan*[®] para análise de expressão dos genes selecionados por *microarray*

O método escolhido para quantificação da expressão gênica foi o método Ct comparativo, o qual se baseia nos valores de *cycle threshold* (Ct) dos genes de referência e genes alvos. O Ct é o ciclo de amplificação onde a fluorescência gerada dentro de uma reação cruza a linha *threshold*, o qual fixa a fase exponencial de amplificação para a coleta de dados

pelo programa de análise. Os valores de ΔCt ($Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{genes de referência}}$) e $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta Ct_{\text{teste}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$) foram calculados e o valor de quantificação relativa ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) foi utilizado de acordo com o método de (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Nesse método, as amostras das linhagens celulares controles foram consideradas calibradoras.

Foram realizados três experimentos independentes para cada linhagem estudada, estando cada um em triplicata. Para a análise estatística dos resultados utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.0 usando ANOVA 2way seguido de Bonferroni *posttest* em comparação ao controle negativo (sem tratamento, adição do diluente DMSO). Consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da citotoxicidade

Para verificar a viabilidade das células de melanoma humano SK-Mel e determinar as concentrações ideais para os testes posteriores, realizou-se o ensaio de citotoxicidade por Alamar Blue e teste de exclusão por Azul de Tripan. Os resultados obtidos pelo método alamar blue apresentados estão apresentados na Tabela 1. A média da CI_{50} em todos os tempos e linhagens testados foi de $3,23 \mu M \pm 0,83$, variando de $1,54 \mu M$ (IC 95% 1,38-1,72) a $9,2 \mu M$ (IC 95% 6,89-12,36). Por outro lado, os controles positivos Doxorrubicina e Dacarbazina apresentaram média de CI_{50} de $2,16 \mu M \pm 0,67$ e $37,14 \mu M \pm 6,44$, respectivamente. A biflorina, assim como os agentes quimioterápicos Doxorrubicina e Dacarbazina, inibiu a proliferação celular das três linhagens de melanoma humano estudadas, sendo a citotoxicidade mais pronunciada na SK-Mel 103, seguida pela SK-Mel 19, e menos citotóxica à SK-Mel 28.

Considerando as CI_{50} apresentadas na tabela 1, foram utilizadas para os experimentos subsequentes as concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 μM de biflorina e de 5,0 μM de Dacarbazina e Doxorrubicina.

Linhagem	SKMEL 19 CI50 (µM) (IC 95%)			SKMEL 28 CI50 (µM) (IC 95%)			SKMEL 103 CI50 (µM) (IC 95%)		
Tempo (h)	24	48	72	24	48	72	24	48	72
Biflorina	2,32 (1,94-2,77)	1,97 (1,77-2,19)	1,6 (1,33-1,89)	9,2 (6,89 -12,36)	3,73 (2,8-4,96)	4,8 (4,09-5,64)	1,85 (1,62-2,10)	1,54 (1,38-1,72)	2,10 (1,94-2,28)
Doxorrubicina	4,19 (3,28-5,36)	0,14 (0,06-0,28)	0,14 (0,07-0,27)	5,68 (4,73-6,83)	1,08 (0,90-1,29)	1,06 (0,94-1,19)	4,16 (3,48-4,98)	1,75 (1,14-2,68)	1,31 (1,01-1,26)
Dacarbazina	56,59 (49,88-64,20)	40,96 (37,36 – 44,90)	30,46 (25,76 – 36,02)	21,73 (18,15-26,02)	21,51 (16,89-27,40)	21,45 (20,76-22,81)	78,85 (63,09-98,54)	34,05 (27,37-42,35)	28,64 (26,38-31,10)

Tabela 1 – CI₅₀ da Dacarbazina, Doxorrubicina e biflorina nas linhagens SK-Mel 19, 28 e 103 após 24, 48 e 72 horas de tratamento obtidas pelo método Alamar Blue. O resultado representa a média das CI₅₀ de três experimentos independentes. Utilizou-se regressão não linear para obtenção das CI₅₀ considerando intervalo de confiança de 95%.

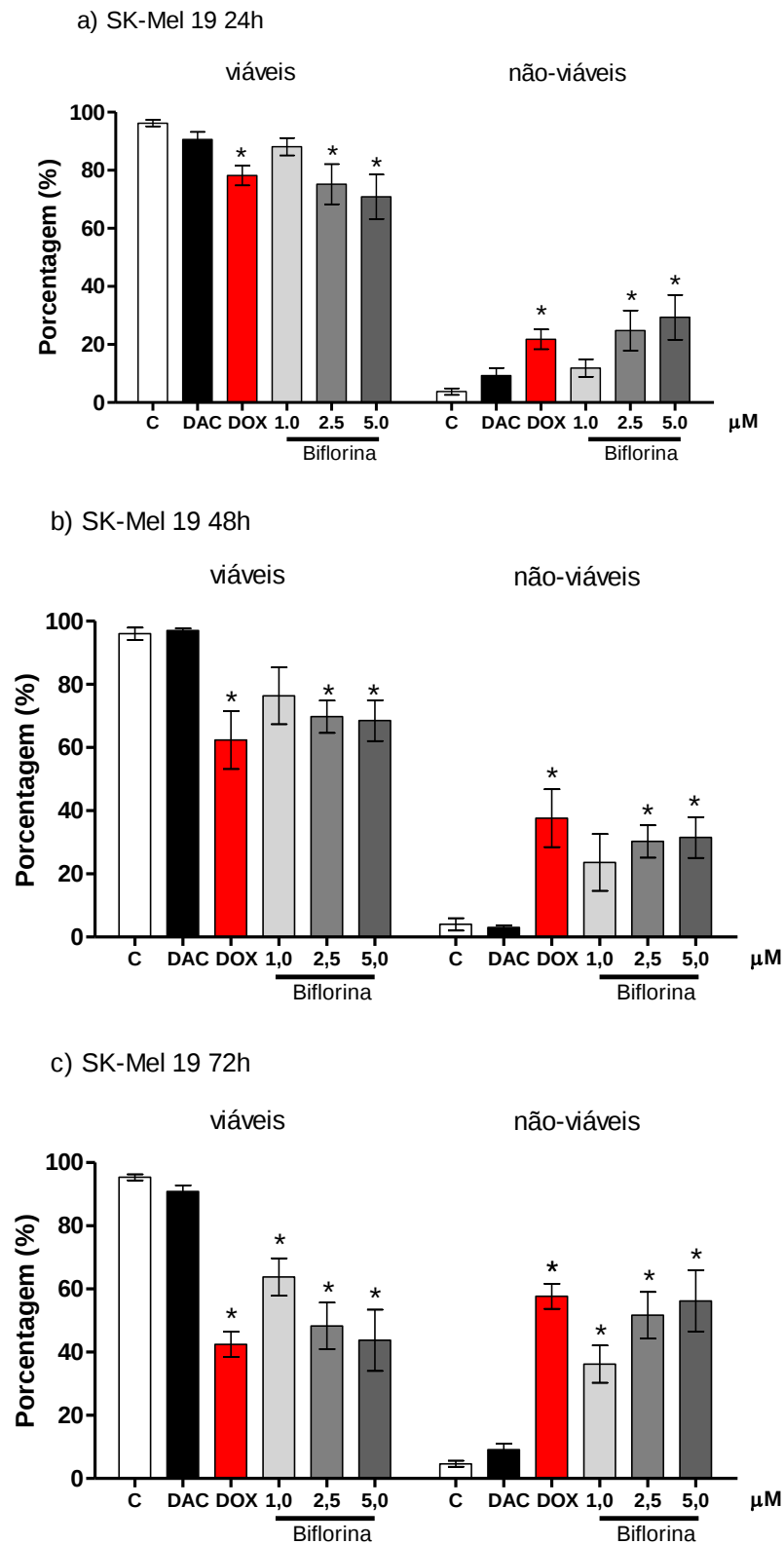


Gráfico 1 - Inibição do crescimento celular da SK-Mel 19 em (a) 24 horas, (b) 48 horas e (c) 72 horas de tratamento com biflorina, DAC-dacarbazina 5μM e DOX-doxorrubicina 5μM. Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$, comparando com o controle negativo.

O gráfico 1 apresenta os resultados de inibição do crescimento celular da SK-Mel 19 pelo método de exclusão por azul de Tripán. Observa-se que nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM houve diminuição significativa de células viáveis e, consequentemente, aumento significativo de células não-viáveis em 48 e 72 h de tratamento ($p < 0,05$). Após 72 horas de tratamento a 5,0 μM a biflorina apresentou 43,78% $\pm$ 9,70 de células viáveis e 56,22% $\pm$ 9,70 de células não-viáveis, não sendo significativamente diferente da Doxorrubicina nas mesmas condições (42,44% $\pm$ 4,02 de células viáveis e 57,67% $\pm$ 3,95 de não-viáveis).

Os resultados de inibição do crescimento celular da SK-Mel 28 (gráfico 2) mostram que houve diminuição significativa de células viáveis e aumento significativo de células não-viáveis, em 48 h e 72 h de tratamento, com biflorina na concentração de 5,0 μM . Novamente a biflorina apresentou atividade equivalente a Doxorrubicina. Em 72h a biflorina exibiu 82,00% $\pm$ 4,60 de células viáveis e 18,00% $\pm$ 4,60 de não-viáveis, enquanto que a Doxorrubicina mostrou 89,11% $\pm$ 3,47 de viáveis e 10,89% $\pm$ 3,47 de não-viáveis.

A biflorina induziu inibição significativa do crescimento celular na linhagem SK-Mel 103 nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM causando 100% de morte celular na concentração de 5,0 μM em 72 horas (gráfico 3), em contraposição a 76,11% $\pm$ 4,86 da Doxorrubicina nas mesmas condições.

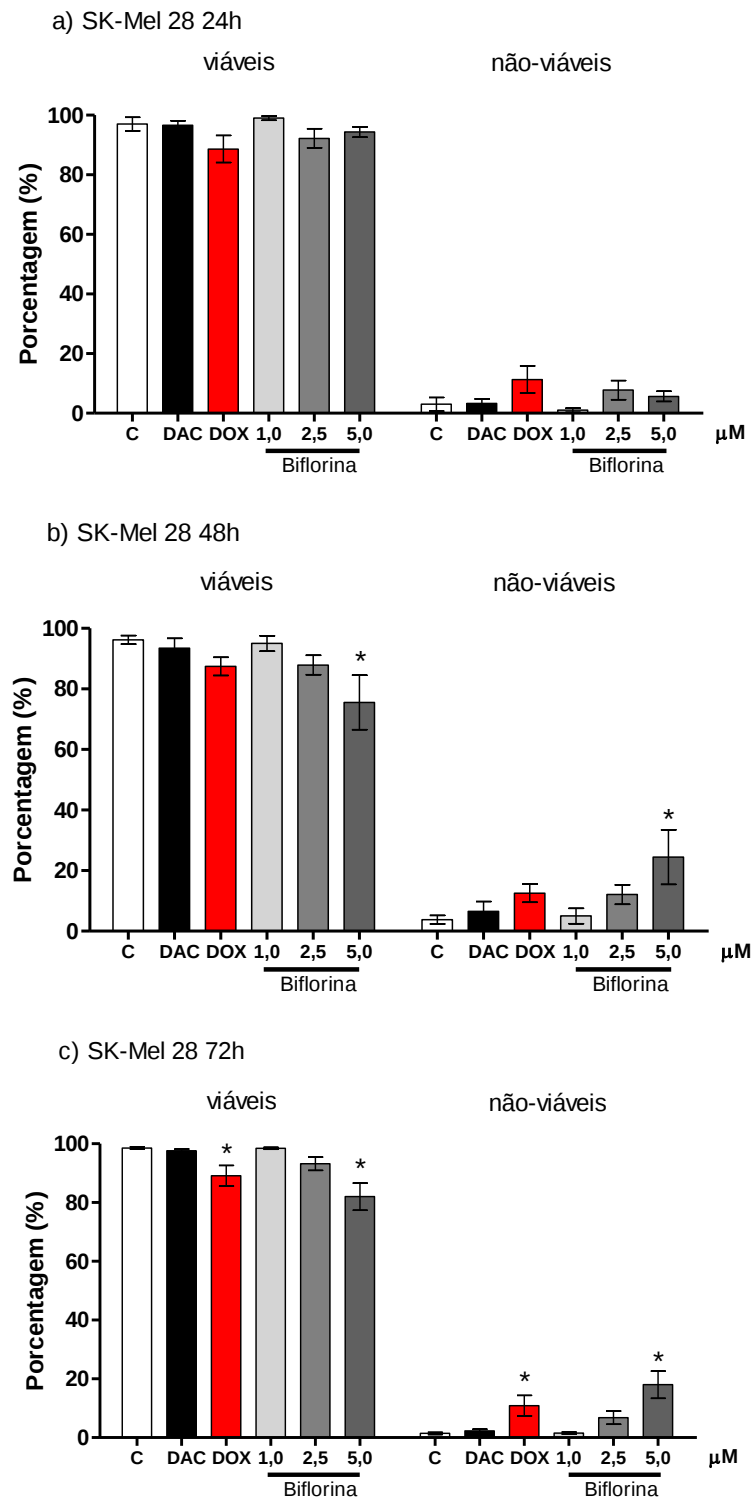


Gráfico 2 - Inibição do crescimento celular da **SK-Mel 28** em (a) 24 horas, (b) 48 horas e (c) 72 horas de tratamento com biflorina, DAC-dacarbazina 5μM e DOX-doxorrubicina 5μM. Os dados apresentam os resultados em triplicata de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ comparando com o controle negativo.

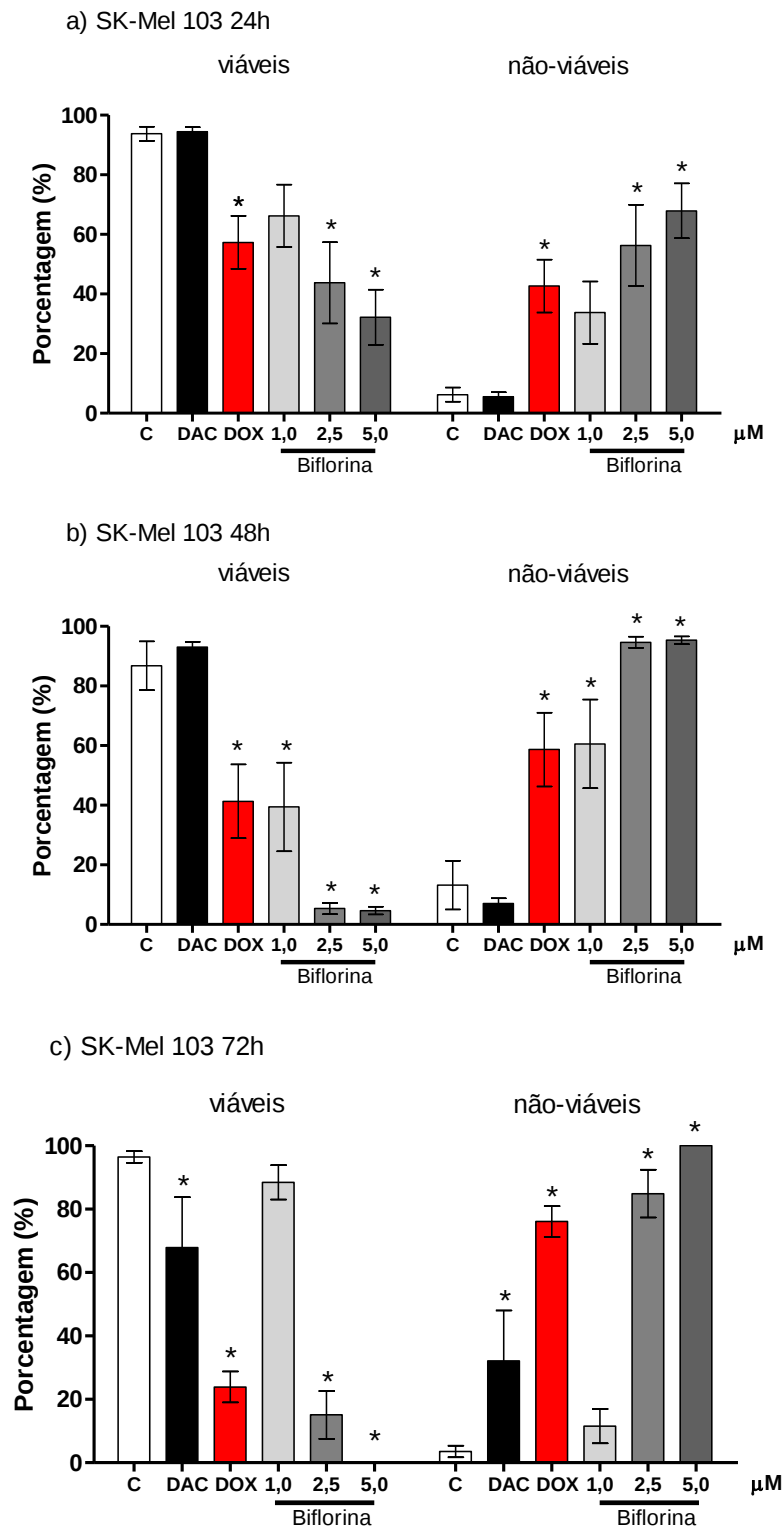


Gráfico 3 - Inibição do crescimento celular da SK-Mel 103 em (a) 24 horas, (b) 48 horas e (c) 72 horas de tratamento com biflorina, DAC-dacarbazina 5µM e DOX-doxorrubicina 5µM. Os dados apresentam os resultados em triplicata de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ comparando com o controle negativo.

Pelo ensaio de exclusão por Azul de Tripan, verificou-se a diminuição da viabilidade celular e o aumento da citotoxicidade de forma proporcional e dose dependente nas linhagens SK-Mel 19 (gráfico 1), SK-Mel 28 (gráfico 2) e SK-Mel 103 (gráfico 3) tratadas com biflorina nas concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 μM .

Comparando os diferentes tempos de tratamento em uma mesma linhagem celular verificou-se que houve diferença estatística significativa na porcentagem de viabilidade nas células tratadas com biflorina. Após 72 h, a linhagem SK-Mel 19 apresentou diferença estatística significativa em todas as concentrações testadas comparando com o tempo de 24 h; enquanto que nos tempos de 48 h e 72 h houve diferença apenas nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM . Na linhagem SK-Mel 28 somente após 48 h de tratamento houve diferença significativa na concentração de 5,0 μM , em relação ao tempo de 24h. Entretanto, na linhagem SK-Mel 103, somente em 48 h a 2,5 μM houve diferença estatística significativa, também em comparação ao tempo de 24 horas (gráfico 4).

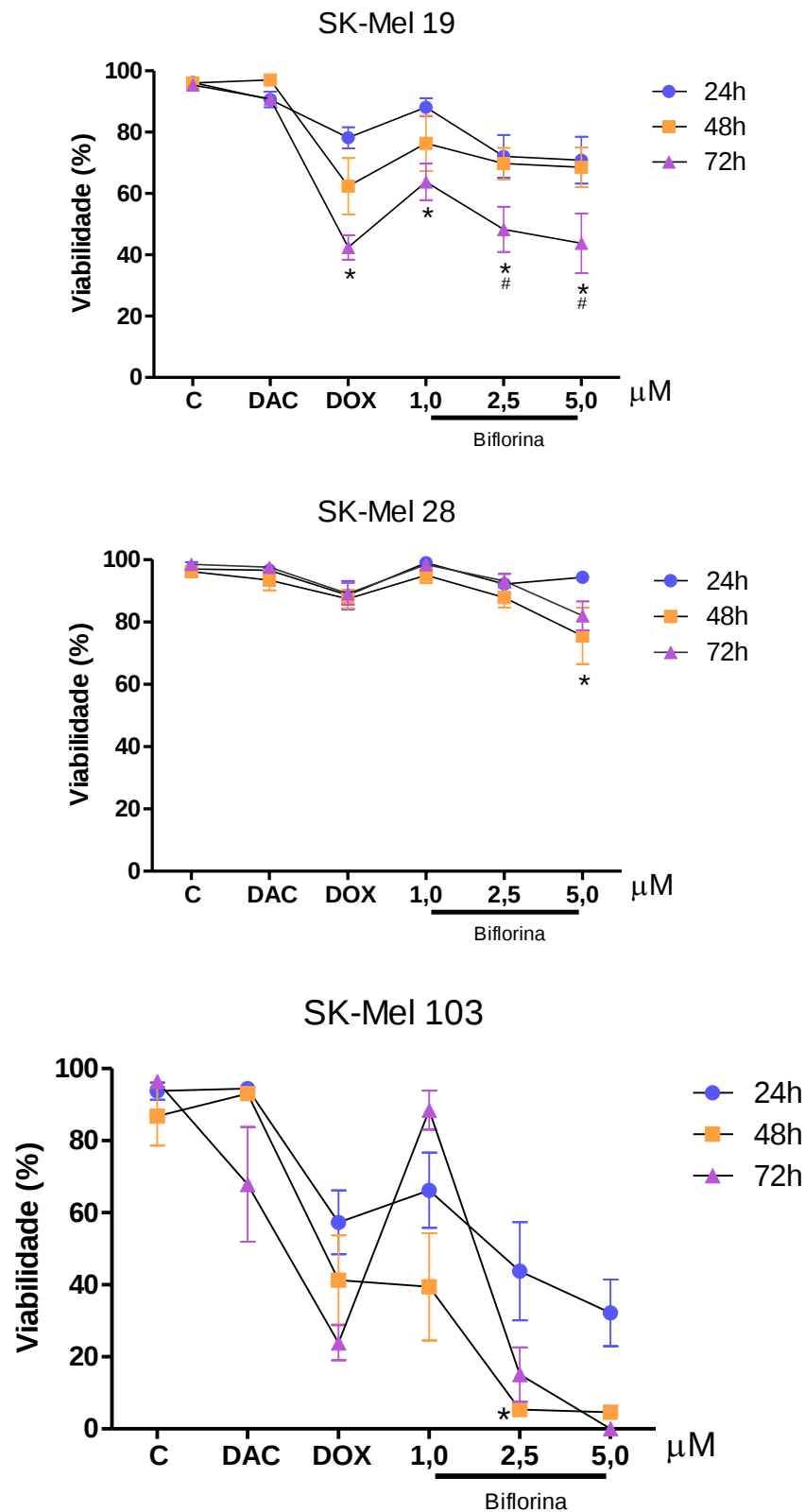


Gráfico 4 - Inibição da proliferação celular das linhagens SK-Mel 19, SK-Mel 28 e SK-Mel 103 em diferentes tempos de tratamento (24, 48, 72h) com biflorina, DAC-dacarbazina 5μM e DOX-doxorrubicina 5μM. Os dados apresentam os resultados em triplicata de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$, sendo que *comparando com 24 horas de tratamento e # comparando com 48 horas de tratamento.

Em relação a porcentagem de morte celular, a linhagem SK-Mel 19, assim como a SK-Mel 103 apresentaram morte celular significativa nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM em todos os tempos de tratamento. Na linhagem SK-Mel 28 a biflorina a 5,0 μM causou morte celular significativa apenas após 48 e 72 horas de tratamento (gráfico 5).

Entretanto, a linhagem SK-Mel 28 em relação à SK-Mel 19 apresentou sensibilidade maior a biflorina ao longo do tempo de tratamento, sendo assim, em 24 horas existe diferença significativa apenas em 5,0 μM ; em 48 horas, nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM e; em 72 horas, em todas as concentrações testadas. Quanto à comparação da SK-Mel 103 com a SK-Mel 19, verifica-se diferença estatística nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM em 24 horas e em 1,0, 2,5 e 5,0 μM em 48 e 72 horas. Adicionalmente, comparando as SK-Mel 28 e 103 houve diferença significativa em todas as concentrações e tempos de tratamento testados.

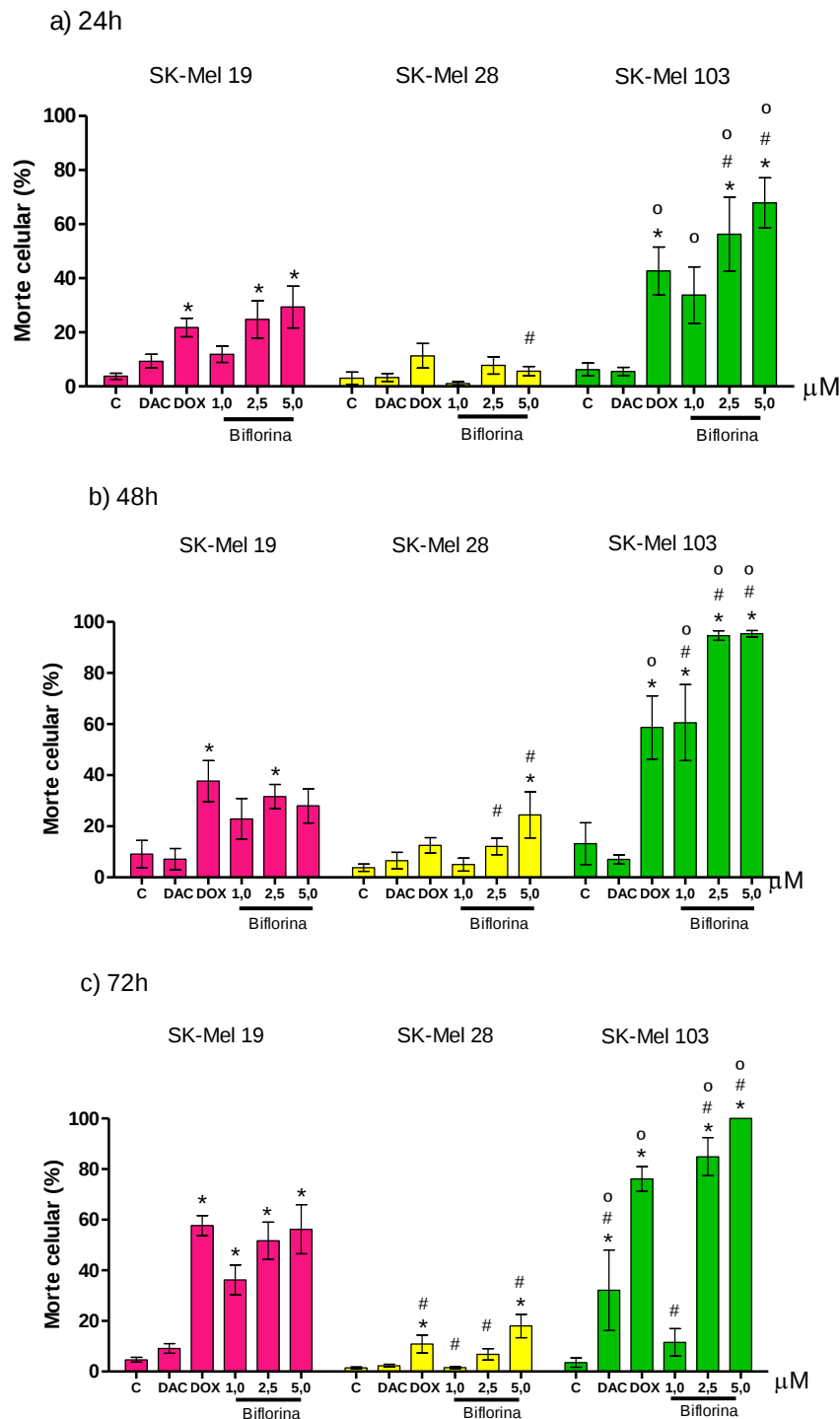


Gráfico 5 -Porcentagem de morte celular em (a) **24 horas** de tratamento; (b) **48 horas** de tratamento e; (c) **72 horas** de tratamento com biflorina, DAC-dacarbazina 5μM e DOX-doxorrubicina 5μM. São apresentadas as médias dos resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni *posttests*. Consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$ sendo *comparação dos tratamentos com o controle negativo na mesma linhagem; # comparação dos tratamentos das SK-Mel 28 e 103 com a SK-Mel 19 e; ° comparação dos tratamentos entre SK-Mel 28 e 103.

5.2 Avaliação da morfologia celular

5.2.1 Coloração por cristal violeta

Para visualizar a inibição da proliferação e a morfologia celular após tratamento de 24 horas com biflorina 1,0, 2,5 e 5,0 μM , realizou-se a coloração com cristal violeta das células em monocamada em placas de 6 poços. Morfologicamente as células não tratadas (figura 11A) apresentam critérios de malignidade tais como aumento da relação núcleo/citoplasma, hipercromasia nuclear, contorno nuclear irregular, multinucleação, cromatina granulosa, halo perinuclear. Após o tratamento com a biflorina observa-se citólise (figura 11- B1) com aumento de restos celulares dispersos, vacuolização do citoplasma (figura 11-B2), desarranjo da cromatina com fragmentação (figura 11-B3).

Nas Figuras 12, 13 e 14 observa-se a diminuição discreta do número de células à medida que há o aumento da concentração de biflorina. Isso pode ser verificado tanto pela diminuição da intensidade da cor azul de um poço para o outro, macroscopicamente, quanto pela visualização dos campos em cada poço microscopicamente. Tais observações não são tão evidentes devido ao fato que a biflorina não causa morte celular expressiva em 24 horas de tratamento.

A linhagem SK-Mel 28 apresenta pouca diferença entre as concentrações de biflorina após tratamento de 24 horas, quando comparado com as linhagens SK-Mel 19 e 103, em que a diferença pode ser observada mais facilmente.

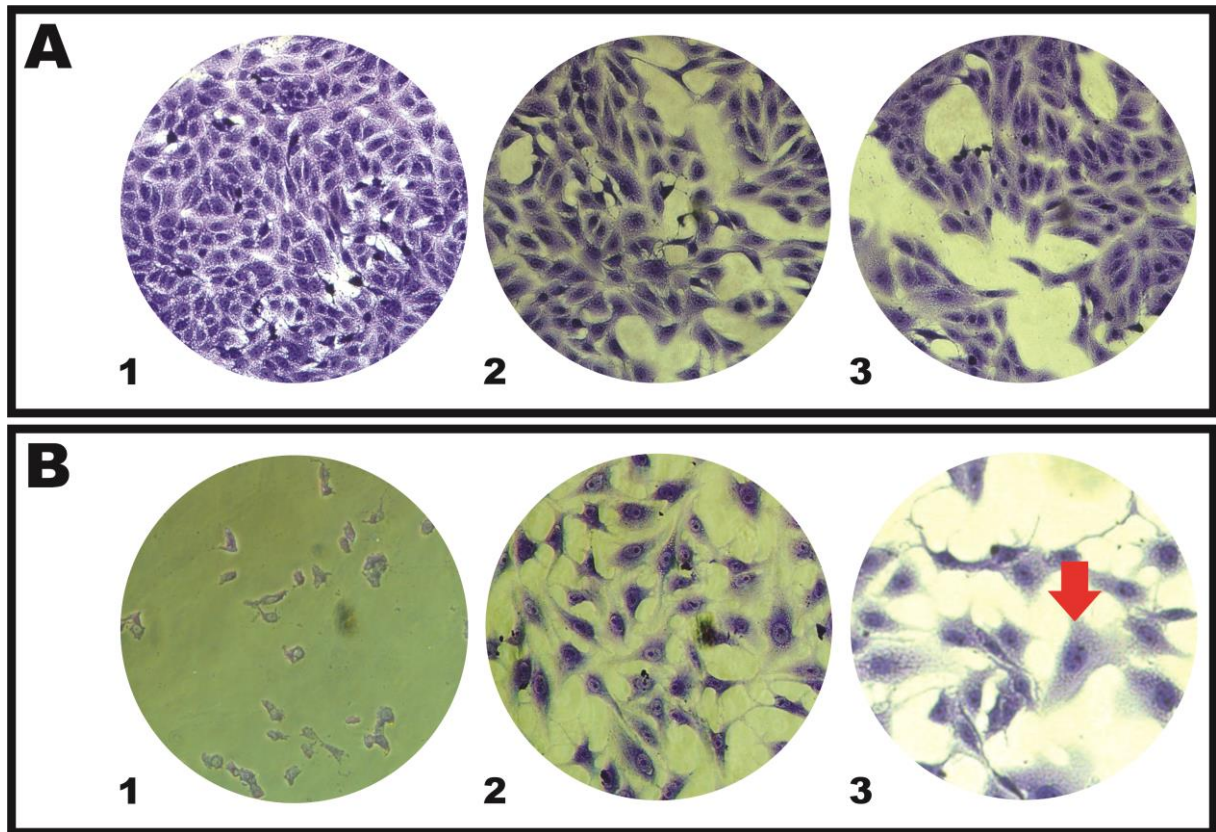


Figura 11 – Alterações morfológicas encontradas nas linhagens SK-Mel após 24 horas de tratamento com biflorina. As fotos são representativas de três experimentos independentes. A – células após 24h de exposição ao DMSO representando o controle negativo de A.1 SK-Mel 19, A.2-SK-Mel 28, e A.3 SK-Mel 103, ambas no aumento de 400x apresentando ausência de restos celulares dispersos e aspecto celular íntegro. B – células após tratamento com biflorina, aumento de 200x. B.1 apresenta SK-Mel 19 lisadas após tratamento com biflorina 5,0 μ M por 24 horas com perda de citoplasma e aparecimento de restos celulares dispersos. B.2 apresenta SK-Mel 28 após tratamento com biflorina a 5,0 μ M por 24 horas com frequente aparecimento de vacúolos no citoplasma. B.3 após tratamento com 2,5 μ M da biflorina, seta vermelha mostra célula SK-Mel 103 apresentando núcleo com fragmentação da cromatina.

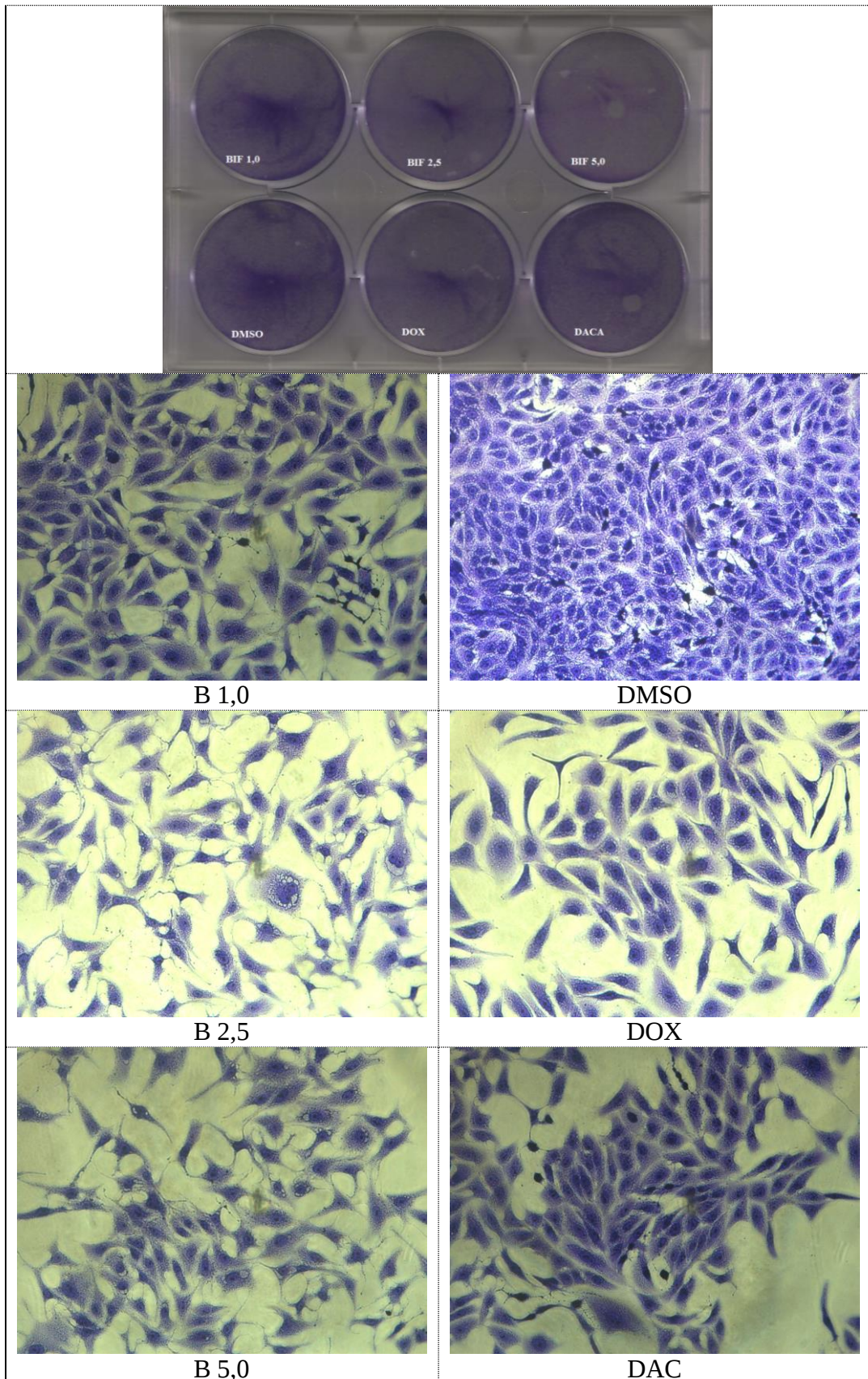


Figura 12 -Morfologia da SK-Mel 19 após 24 horas de tratamento com biflorina. DMSO é o controle negativo, DOX – Doxorubicina 5 μ M e DOX-doxorrubicina 5 μ M. As fotos são representativas de três experimentos independentes e foram obtidas no aumento de 400x.

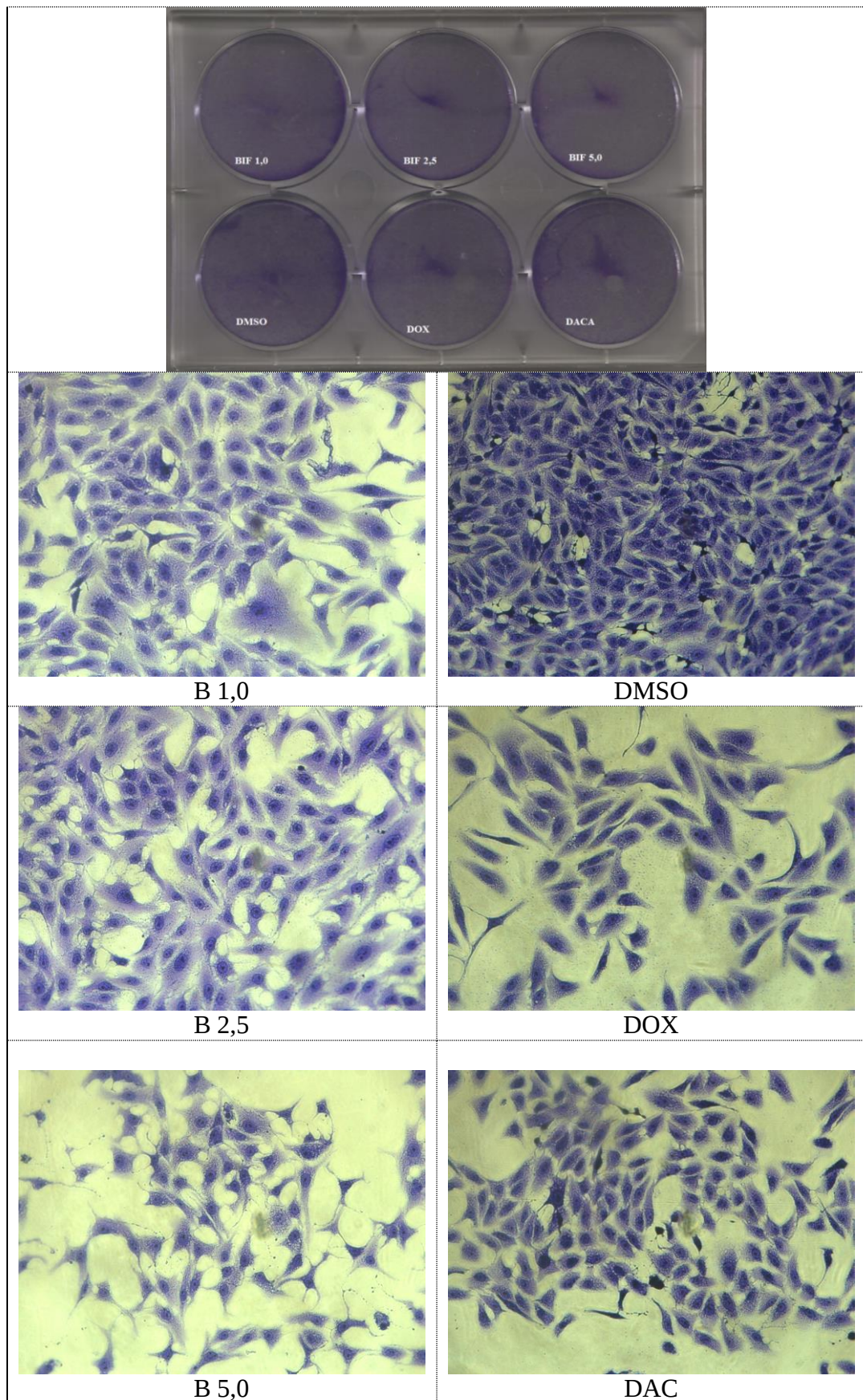


Figura 13 -Morfologia da SK-Mel 28 após 24 horas de tratamento com biflorina. DMSO é o controle negativo, DOX – Doxorubicina 5,0 μM e DAC – Dacarbazina a 5,0 μM . As fotos são representativas de três experimentos independentes e foram obtidas no aumento de 400x.

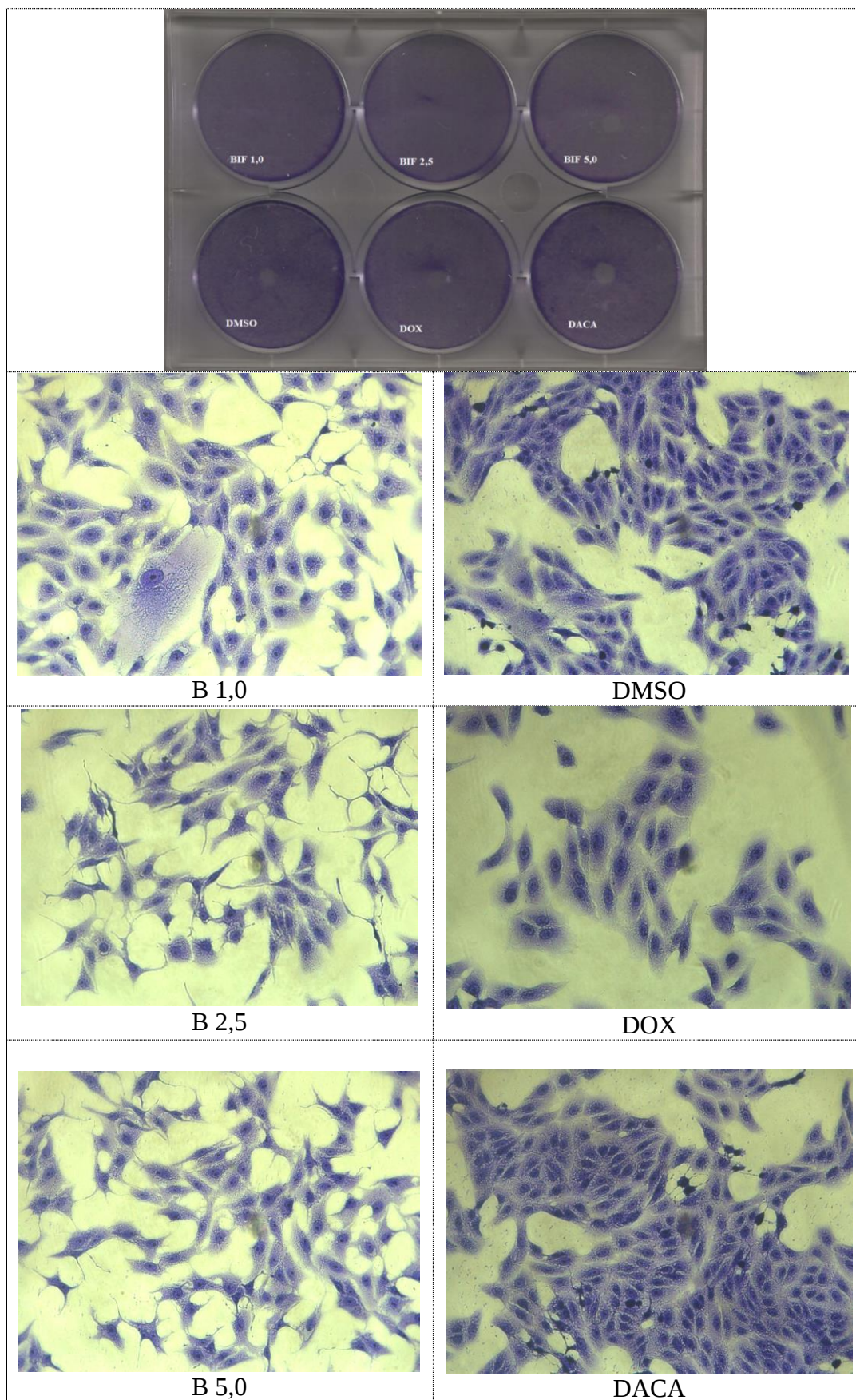


Figura 14 -Morfologia da SK-Mel 103 após 24 horas de tratamento com biflorina. DMSO é o controle negativo, DOX – Doxorrubicina 5,0 μM e DAC - Dacarbazina a 5,0 μM . As fotos são representativas de três experimentos independentes e foram obtidas no aumento de 400x.

5.3 Mecanismo de morte celular

5.3.1 Coloração diferencial Laranja de Acridina- Brometo de Etídio (LA/BE)

A coloração de células apoptóticas com corantes fluorescentes tais como laranja de acridina e brometo de etídio é considerado um método correto para avaliar a mudança na morfologia nuclear (D. BASKIC et al., 2006). Conforme mostrado na figura 15, através da morfologia (condensação da cromatina, colapso nuclear e fragmentação eventual) é possível distinguir diferentes populações de células viáveis, apoptóticas e necróticas.

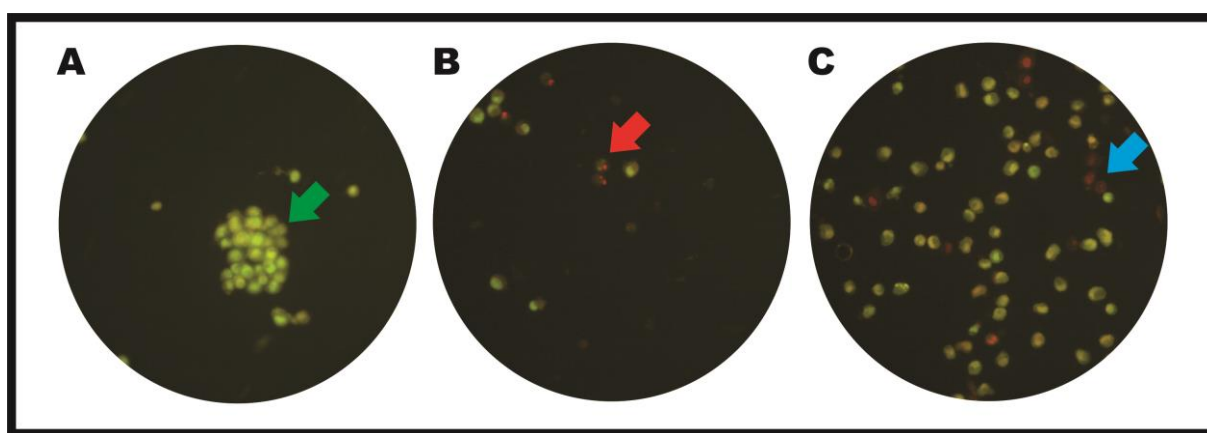


Figura 15 - Imagens de células da linhagem SK-Mel 19 coradas com LA/BE tratadas com biflorina durante 24h. (a) células viáveis em verde (seta verde); (b) células apoptóticas apresentando núcleo laranja/vermelho e citoplasma verde em “blebbing” (seta vermelha); (c) células necróticas com núcleo e citoplasma vermelhos (seta azul).

Os resultados de indução de morte celular da SK-Mel 19 (gráfico 6) mostram que houve diminuição significativa de células viáveis e aumento significativo de células apoptóticas, em 24h, 48 h e 72 h de tratamento, com biflorina em todas as concentrações testadas. Em 72h a biflorina a 5,0 μ M exibiu 98,67% de células apoptóticas, enquanto que a Doxorrubicina mostrou 97,15%, não havendo diferença significativa entre ambas.

Os resultados de indução de morte celular na SK-Mel 28 (gráfico 7) mostram que houve diminuição significativa de células viáveis e aumento significativo de células apoptóticas, em 24h, 48 h e 72 h de tratamento, com biflorina nas concentrações de 2,0 e

5,0 μ M. Em 72h a biflorina a 5,0 μ M exibiu média de 72,22% de células apoptóticas, e novamente não apresentou diferença estatisticamente significativa da Doxorrubicina (média de 75,93% de apoptose).

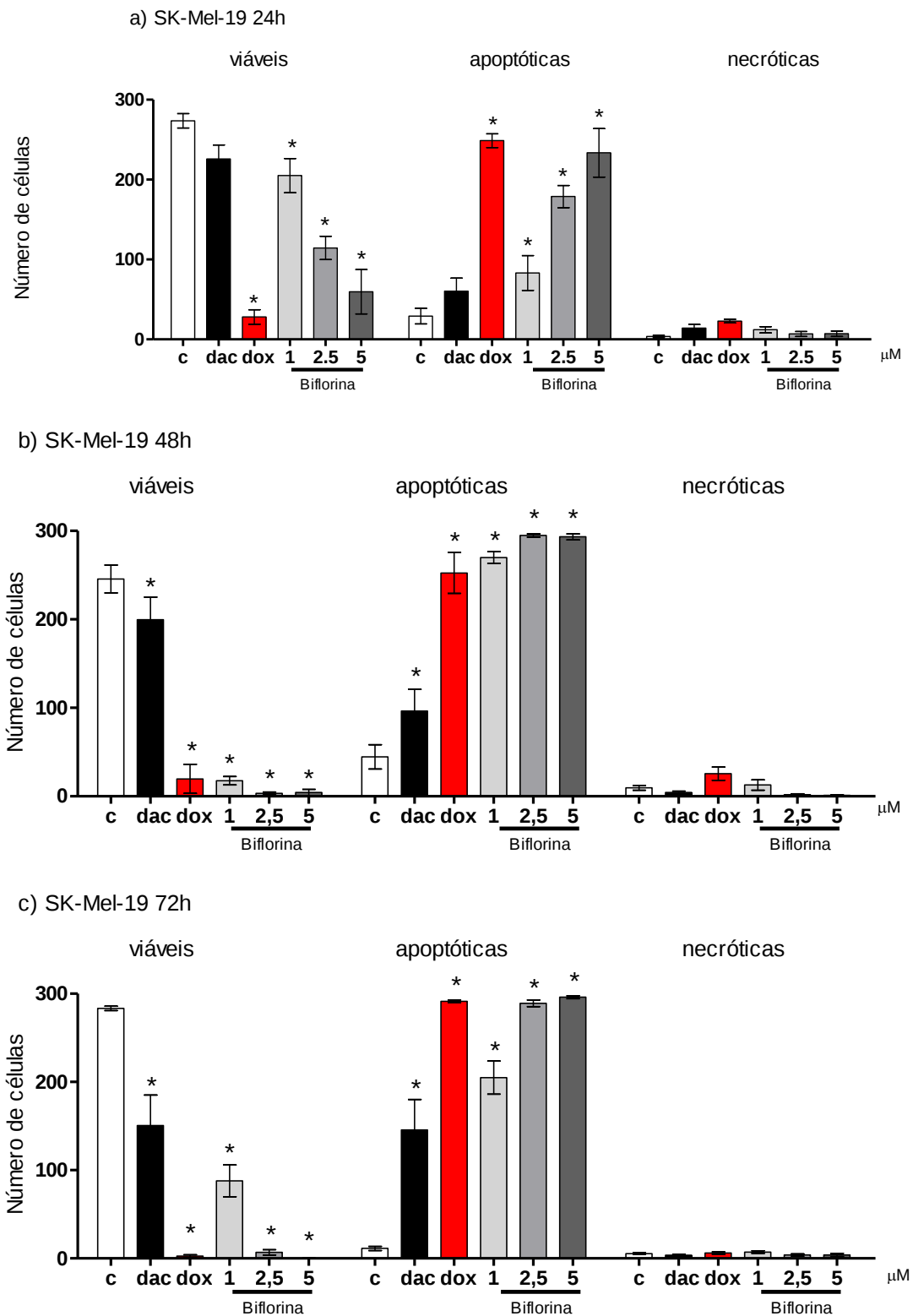


Gráfico 6 - Tipo de morte celular induzida pela biflorina, dac-dacarbazina 5µM e dox-doxorrubicina 5µM nas células **SK-Mel 19** após tratamento por (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas. São apresentados os resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ frente ao controle negativo.

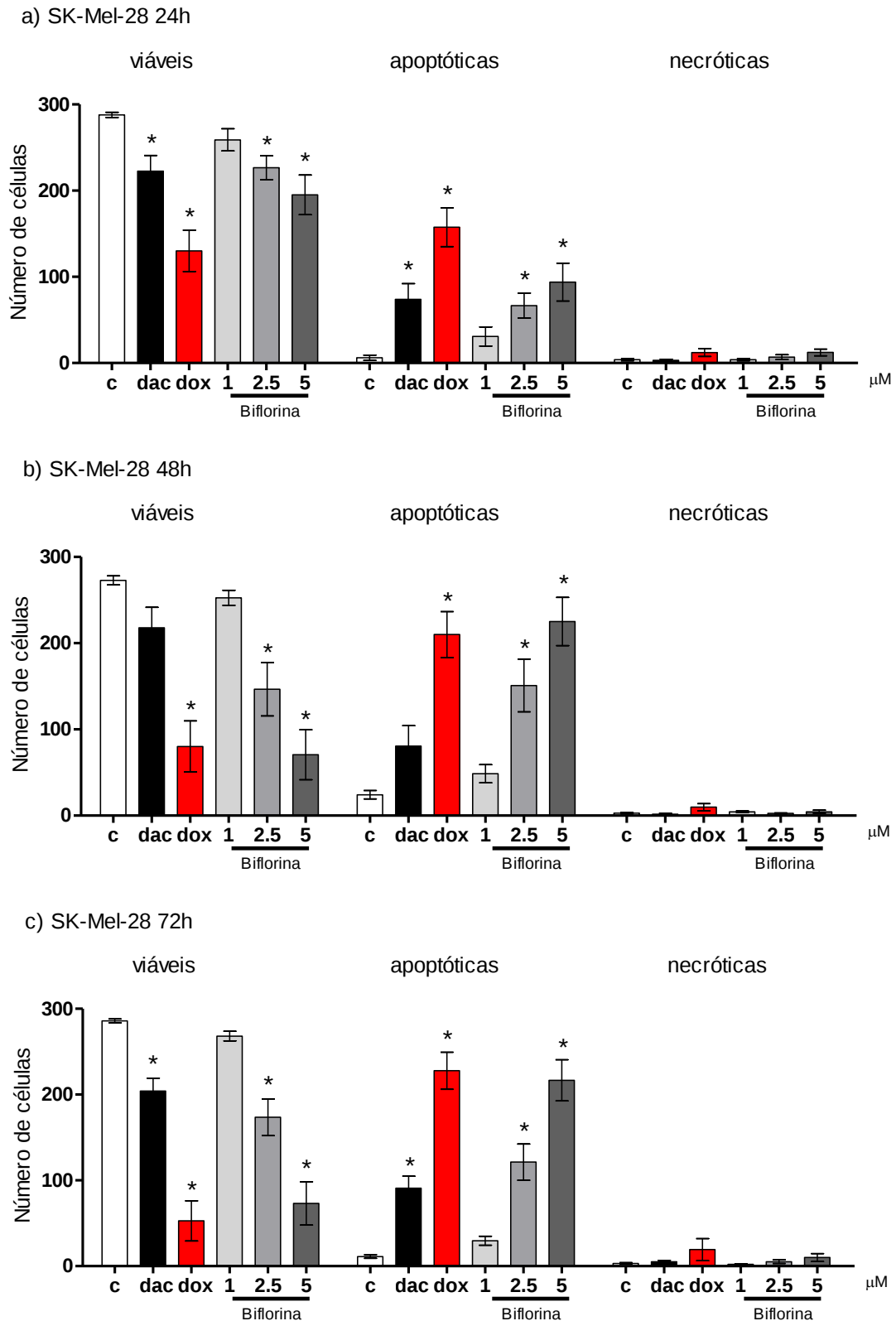


Gráfico 7 - Tipo de morte celular induzida pela biflorina, dac-dacarbazina 5µM e dox-doxorrubicina 5µM, nas células **SK-Mel 28** após tratamento por (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas. São apresentados os resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ frente ao controle negativo.

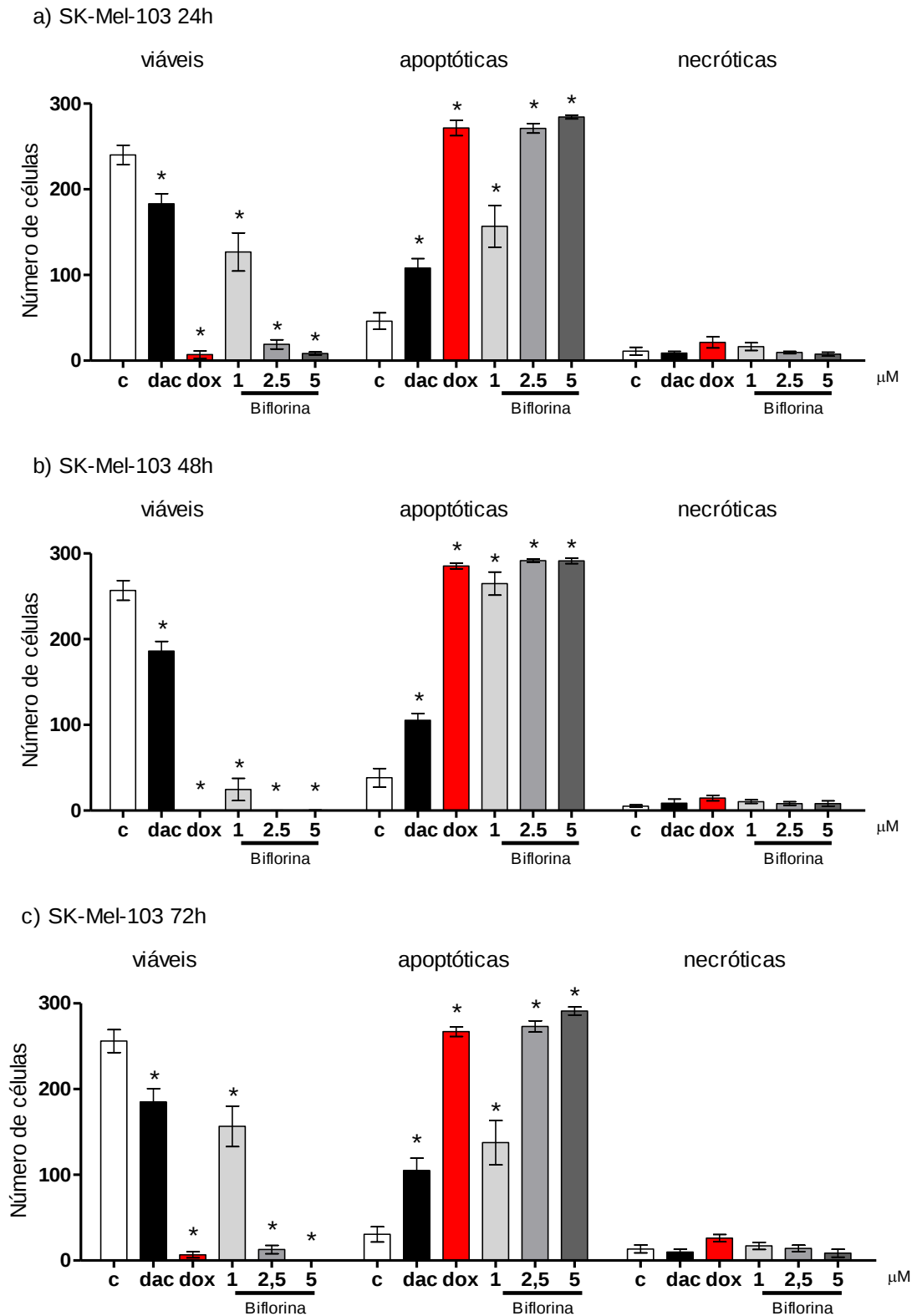


Gráfico 8 -Tipo de morte celular induzida pela biflorina, dac-dacarbazina 5µM e dox-doxorrubicina 5µM, nas células **SK-Mel 103** tratamento de (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas. São apresentados os resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ frente ao controle negativo.

Os resultados de indução de morte celular na SK-Mel 103 (gráfico 8) mostram que houve diminuição significativa de células viáveis e aumento significativo de células apoptóticas, em 24h, 48 h e 72 h de tratamento, com biflorina nas concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 μM . Em 72h a biflorina (5,0 μM) exibiu média de 97,03% de células apoptóticas, e novamente não apresentou diferença estatística da Doxorubicina (média de 89,00% de apoptose).

Nas linhagens SK-Mel 19 e 103 foi observado que houve uma diminuição das células viáveis de forma inversamente proporcional ao aumento da concentração de biflorina. Adicionalmente, houve o aumento no número de células apoptóticas, havendo diferença estatisticamente significativa em todas as concentrações testadas. Por outro lado, o número de células necróticas não variou significativamente em nenhum dos tratamentos. De forma diferenciada, a linhagem SK-Mel-28 demonstrou número de células viáveis semelhante ao controle negativo, e não apresentou apoptose significativa na concentração de 1,0 μM em nenhum dos tempos de tratamento avaliados.

Comparando a porcentagem de células em apoptose entre as linhagens (gráfico 9), houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens SK-Mel 19 e 28 nas concentrações de 1,0, 2,5 e 5,0 μM em 24 horas, e apenas nas concentrações 1,0 e 2,5 μM em 48 e 72 horas. Entre as SK-Mel 28 e 103 houve diferença significativa em todas as concentrações testadas, com exceção a 2,5 μM em 48 horas de tratamento. Entre as SK-Mel 19 e 103 houve diferença a 5,0 μM em 24 horas e a 1,0 μM em 48 e 72 horas de tratamento. Por meio dessa comparação é possível visualizar que a SK-Mel 28 foi a que causou menos de 80% de apoptose mesmo na maior concentração (5,0 μM) e período de tempo testado (72 h), o que reafirma uma menor susceptibilidade dessa linhagem à ação da biflorina, e corrobora com os resultados de citotoxicidade.

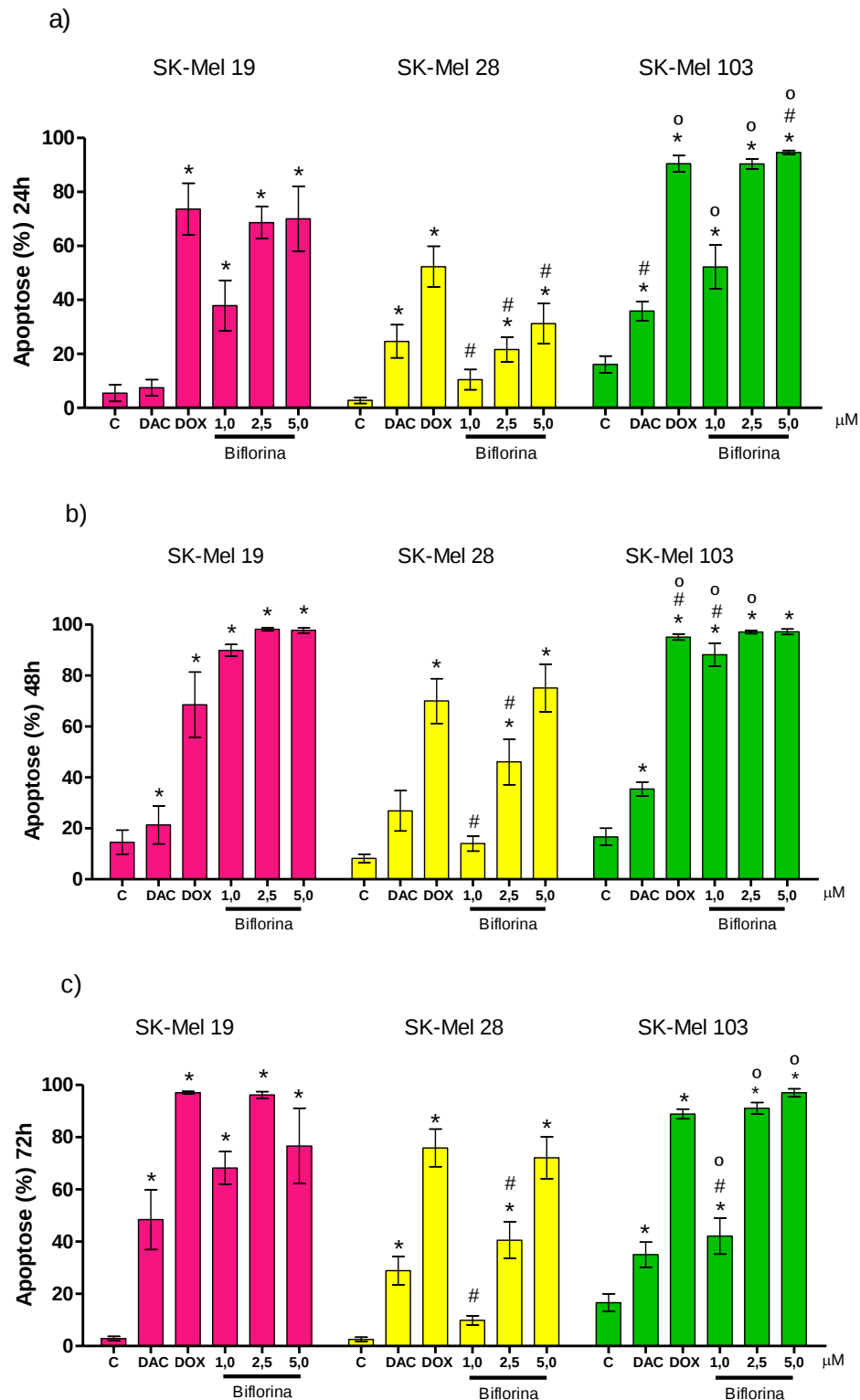


Gráfico 9 – Comparação da porcentagem de apoptose entre as linhagens SK-Mel 19, 28 e 103 após o tratamento de (a) 24 horas; (b) 48 horas; (c) 72 horas com biflorina, dac-dacarbazina 5µM e dox-doxorrubicina 5µM. São apresentadas as médias dos resultados de três experimentos independentes ($\pm$ desvio padrão). Os resultados foram analisados por ANOVA 2way seguido de Bonferroni posttests. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$ sendo *comparação dos tratamentos com o controle negativo na mesma linhagem; # comparação dos tratamentos das SK-Mel 28 com 19, e SK-Mel 103 com a SK-Mel 19 e; ° comparação dos tratamentos entre SK-Mel 28 e 103.

5.4 Ensaio de eletroforese em gel de célula única – Teste do Cometa

5.4.1 Cometa em pH alcalino e neutro

A atividade genotóxica de indução de dano ao DNA de quebra de fita simples e dupla foi avaliada pelo ensaio do cometa alcalino e neutro. Avaliando o dano induzido pela biflorina em células de melanoma humano tratadas nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM pelo teste do cometa em pH alcalino e pH neutro observou-se que houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no comprimento da calda do cometa formada de fragmentos de DNA que migraram após a eletroforese, em relação ao controle negativo. Em ambas as condições eletroforéticas utilizadas, ocorreu pequena migração de DNA nas células tratadas com DMSO (controle negativo), sendo visualizado apenas cometas grau 0 e 1, e alguns grau 2 esporádicos.

Por outro lado, as células tratadas Dacarbazina e Doxorubicina (5,0 μM) observa-se elevada frequência de dano graus 3 e 4. No entanto, no cometa alcalino a biflorina (5,0 μM) apresentou frequência de dano grau 4 superior a Dacarbazina e Doxorubicina na mesma concentração. Porém, o inverso foi verificado no cometa neutro, demonstrando que a biflorina causou maior frequência de dano a quebras de fita dupla, simples e álcali-lábeis que os controles positivos.

A biflorina a 5 μM apresentou, aproximadamente, índice de dano (ID) no cometa alcalino três vezes maior em comparação ao controle negativo. Em relação as linhagens celulares, a biflorina causou ID médio a 5 μM de $105,60 \pm 5,74$ na SK-Mel 19, $112,88 \pm 13,48$ na SK-Mel 28, e $130,90 \pm 7,47$ na SK-Mel 103. Adicionalmente, no cometa neutro a biflorina (5 μM) causou ID médio de $100,00 \pm 3,95$ na SK-Mel 19, $99,38 \pm 5,50$ na SK-Mel 28, e $105,75 \pm 6,48$ na SK-Mel 103.

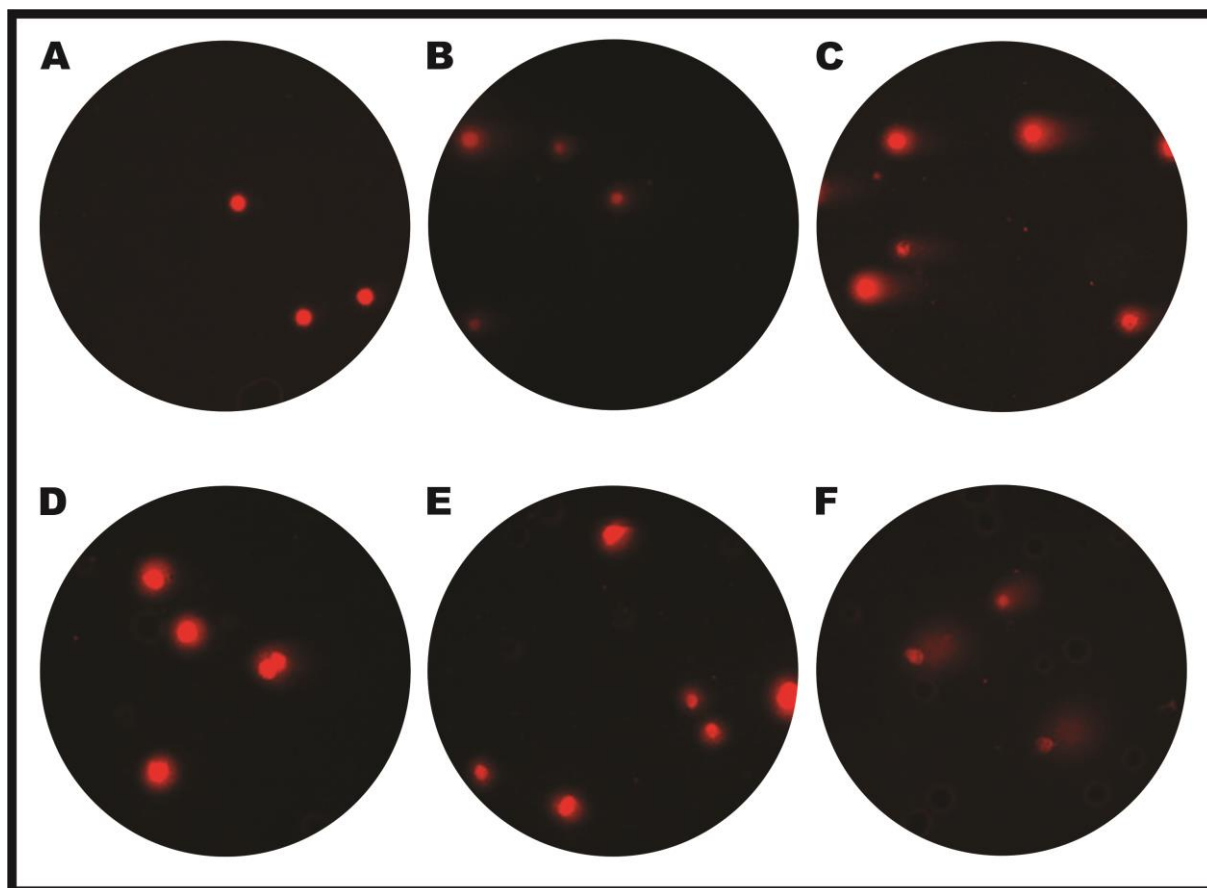


Figura 16 Análise de fragmentação do DNA às células SK-Mel 28 após tratamento por 3 horas com: A –DMSO 0,1% (controle negativo); B - Dacarbazina 5,0 μ M; C - Doxorubicina 5,0 μ M; D- biflorina 1,0 μ M; E – biflorina 2,5 μ M; e F - biflorina 5,0 μ M.

O gráfico 10 apresenta os resultados de índice de dano e frequência de dano causados pela biflorina à SK-Mel 19 pelo ensaio do cometa. Observa-se que, tanto no cometa alcalino quanto no neutro, nas concentrações de 2,5 e 5,0 μ M houve aumento significativo de dano ao DNA, em relação ao controle negativo, após 3 horas de tratamento. A frequência de dano, tanto no cometa alcalino quanto no neutro, demonstrou que a medida que há o aumento da concentração de biflorina ocorre aumento na frequência de dano graus 3 e 4 e diminuição dos graus 0 a 2, sendo essa mudança significativamente diferente do controle negativo.

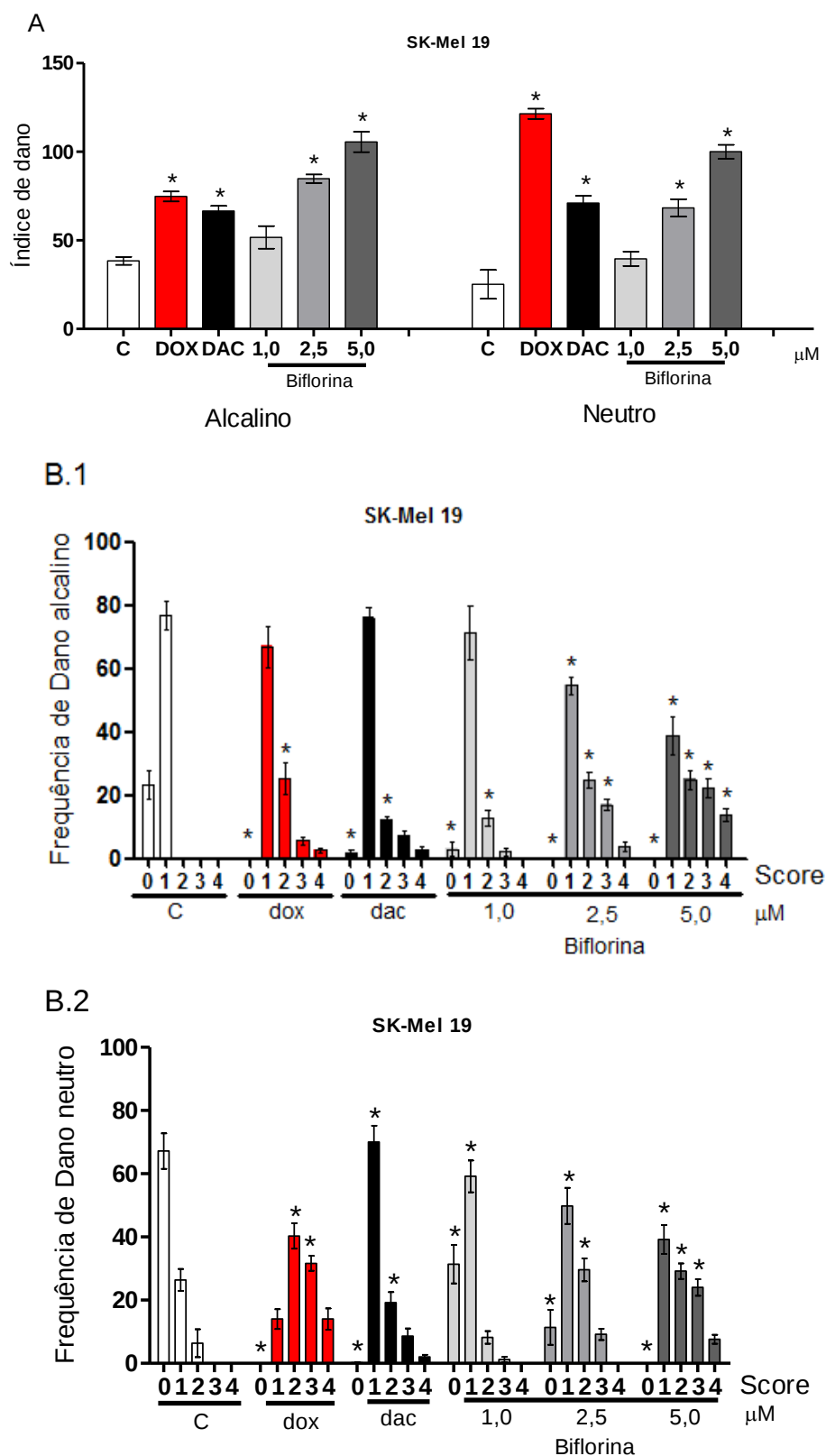


Gráfico 10 - Fragmentação do DNA causada pela biflorina, dacarbazina (dac) 5µM e doxorubicina (dox) 5µM, às células da linhagem **SK-Mel 19**. A. índice de dano em cometa alcalino e neutro; B.1 - frequência de dano por cometa alcalino; B.2 - frequência de dano por cometa neutro. Para o índice de dano usou-se ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey (*Multiple Comparison Test*). Para a frequência de dano usou-se ANOVA *2way* seguido de Bonferroni *posttest*. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$, ambos em relação ao controle negativo.

O índice de dano e frequência de dano causados pela biflorina à SK-Mel 28 pelo ensaio do cometa estão apresentados no gráfico 11. Observa-se que, no cometa alcalino todos os tratamentos utilizados apresentaram índice de dano estatisticamente significativo em relação ao controle negativo. No cometa neutro, apenas a biflorina na concentração de 1,0 μM não apresentou diferença estatística significativa. Adicionalmente, a frequência de dano, tanto no cometa alcalino quanto no neutro, apresentou diminuição da frequência de grau 1 e aumento na frequência de grau 2 e 3, enquanto que o grau 4 não foi significativamente diferente.

O gráfico 12 apresenta os resultados de índice de dano e frequência de dano causados pela biflorina à SK-Mel 103 pelo ensaio do cometa. Observa-se que, tanto no cometa alcalino quanto no neutro, nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM houve diferença significativa no índice de dano ao DNA, em relação ao controle negativo, devido ao aumento de dano ocasionado pelos tratamentos. No tratamento com a biflorina, a diferença foi concentração dependente. Em relação a frequência de dano, no cometa alcalino a biflorina a 5,0 μM causou o aumento significativo na frequência de dano graus 3 e 4. Tal frequência não foi observada no cometa neutro.

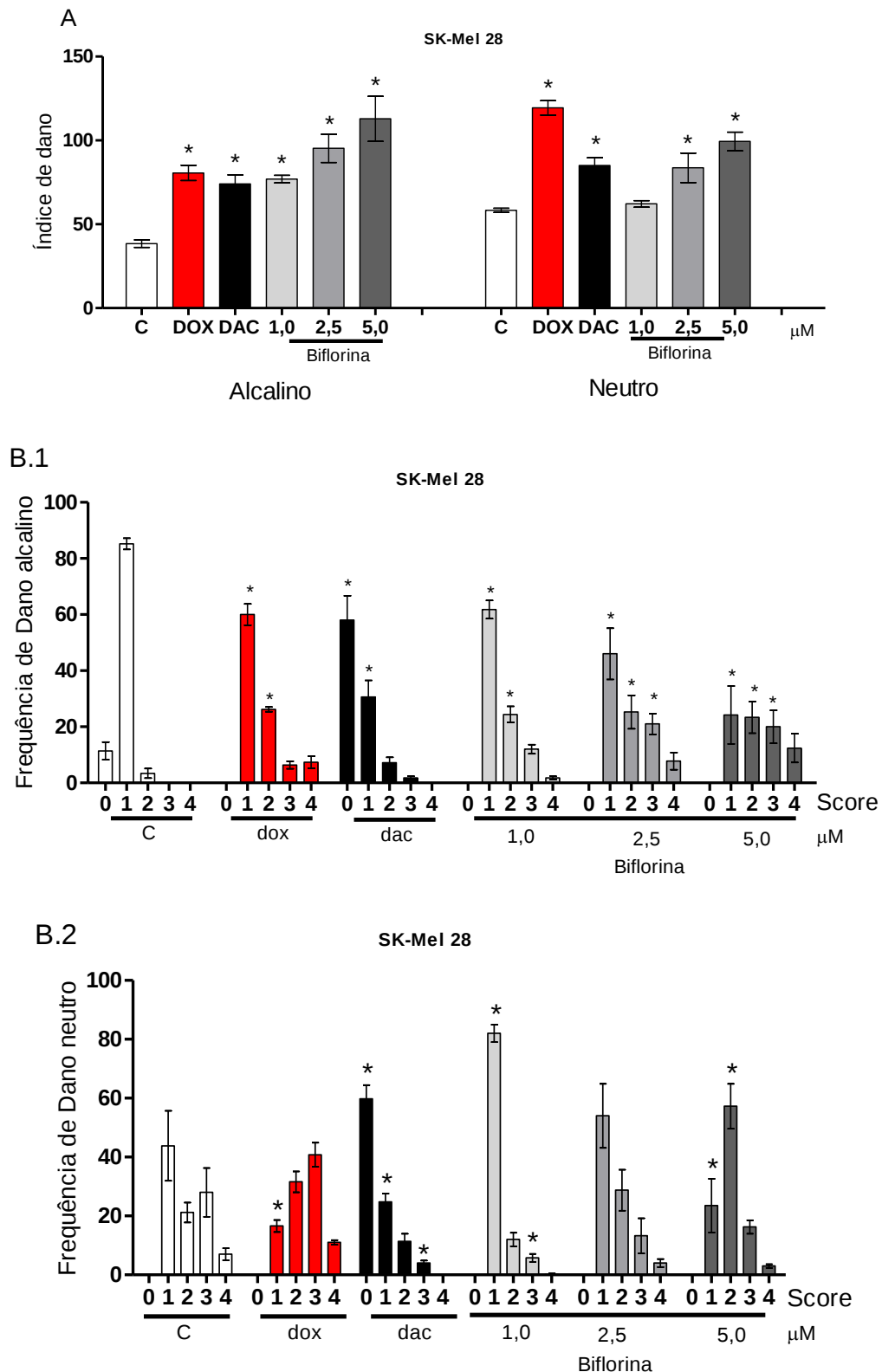


Gráfico 11 - Fragmentação do DNA causado pela biflorina, dacarbazina (dac) 5 μ M e doxorubicina (dox) 5 μ M, às células da linhagem **SK-Mel 28**. A. índice de dano em cometa alcalino e neutro; B.1 - frequência de dano por cometa alcalino; B.2 - frequência de dano por cometa neutro. Para o índice de dano usou-se ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey (*Multiple Comparison Test*). Para a frequência de dano usou-se ANOVA *2way* seguido de Bonferroni *posttest*. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$, ambos em relação ao controle negativo.

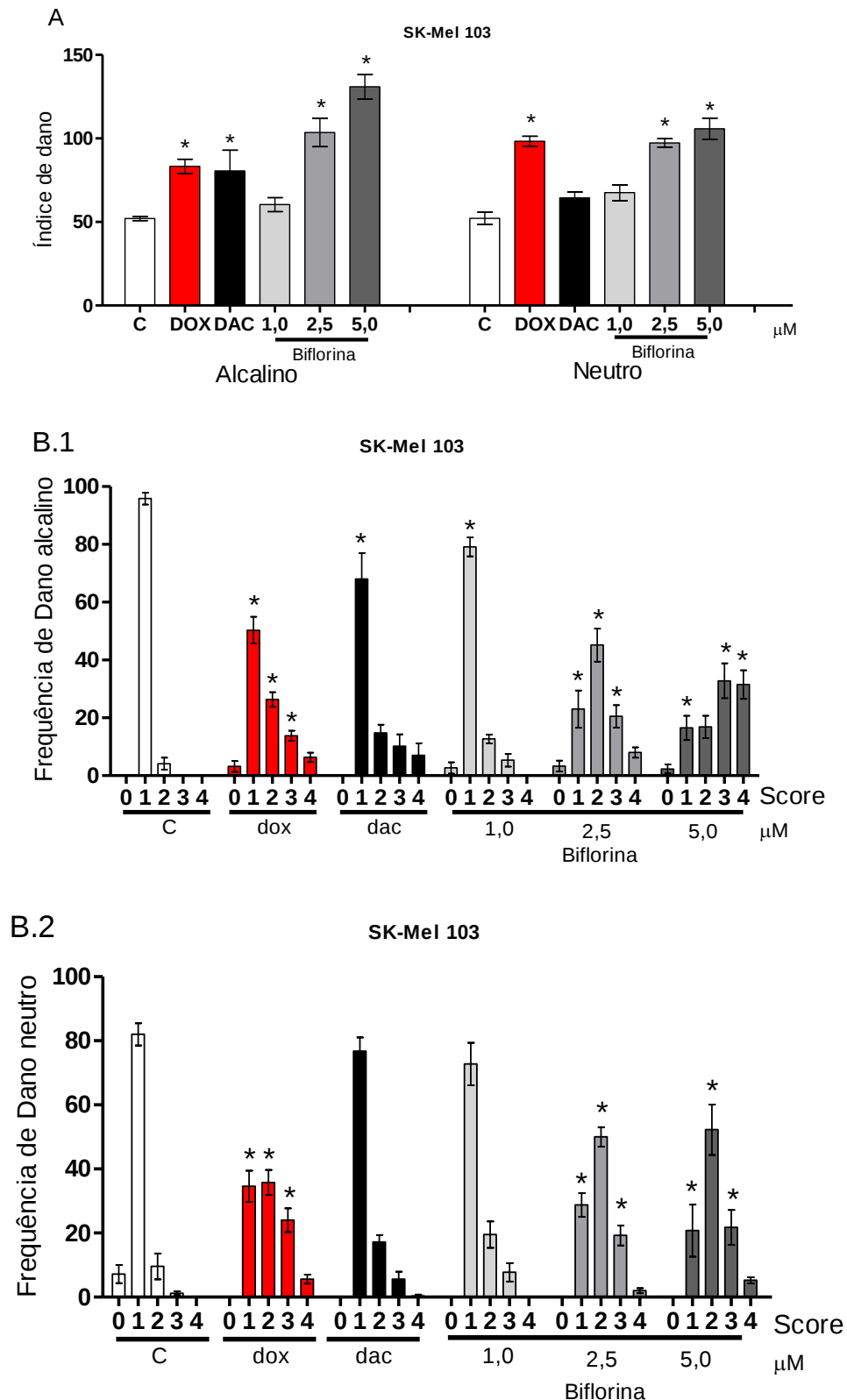


Gráfico 12 - Fragmentação do DNA causada pela biflorina, dacarbazina (dac) 5μM e doxorubicina (dox) 5μM, às células da linhagem **SK-Mel 103**. A. índice de dano em cometa alcalino e neutro; B.1 - frequência de dano por cometa alcalino; B.2 - frequência de dano por cometa neutro. Para o índice de dano usou-se ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey (*Multiple Comparison Test*). Para a frequência de dano usou-se ANOVA *2way* seguido de Bonferroni *posttest*. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com * $p < 0,05$, ambos em relação ao controle negativo.

Comparando-se as linhagens de SK-Mel quanto ao índice de dano no cometa alcalino, verificou-se que de uma forma geral, não houve diferença estatística, com exceção a 1,0 μM na SK-Mel 28 e 5,0 μM na SK-Mel 103. No entanto, no cometa neutro, a linhagem SK-Mel 28 difere no seu controle e na concentração de 1,0 μM de biflorina quando comparada com a SK-Mel 19. De forma semelhante, a SK-Mel 103 apresentou índice de dano do controle e da doxorrubicina estatisticamente diferente da SK-Mel 19. Por outro lado, comparando a SK-Mel 28 com a SK-Mel 103, observa-se que são estatisticamente diferentes os tratamentos com dacarbazina, doxorrubicina e biflorina a 1,0 μM . Portanto, nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM a biflorina apresenta capacidade genotóxica equivalente em todas as linhagens estudadas (gráfico 13).

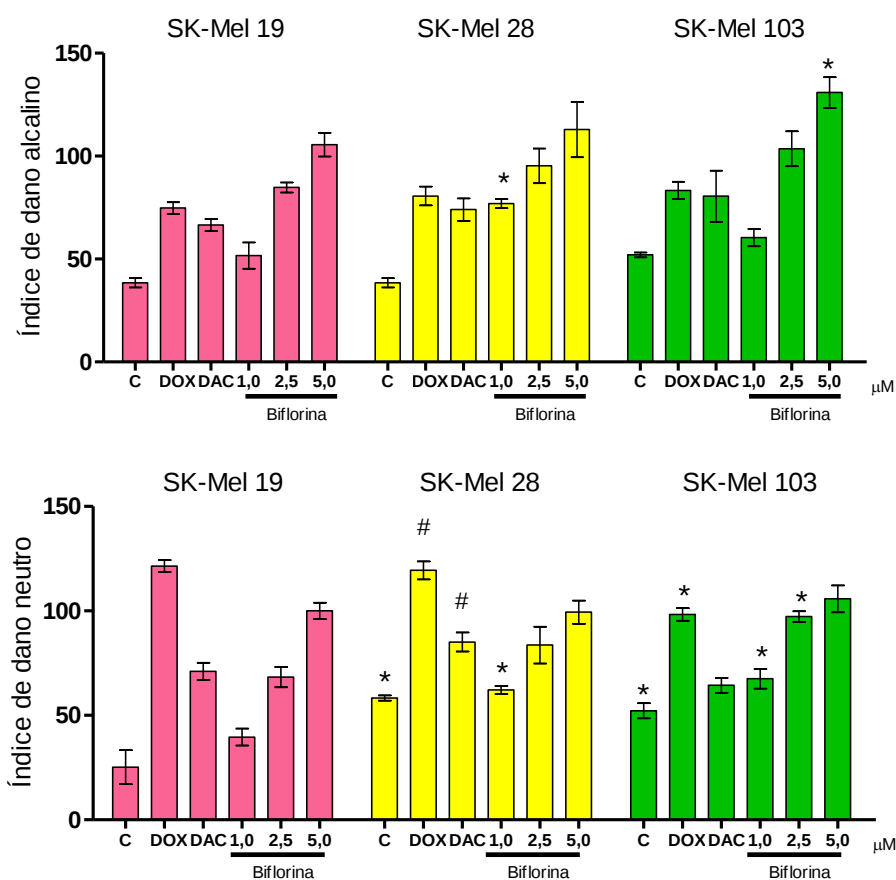


Gráfico 13 - Índice de Dano causado pela biflorina, dacarbazina (dac) 5 μM e doxorrubicina (dox) 5 μM , às células da linhagem nas SK-Mel 19, 28 e 103 (a) por cometa alcalino; (b) por cometa neutro. Para o índice de dano usou-se ANOVA *twoway* seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$, sendo * comparação SK-Mel 28 e 103 com SK-Mel 19, e # comparação SK-Mel 28 com 103.

Com base nos resultados obtidos, a biflorina se revela genotóxica nas linhagens de melanoma humano nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM após 3 horas de tratamento, causando tanto dano as fitas simples, duplas e sítio álcali-lábeis de DNA. Não havendo especificidade por alguma linhagem.

5.4.2 Cometa modificado

O gráfico 14 apresenta os resultados de índice de dano causado pela biflorina às SK-Mel 19, 28 e 103 pelo ensaio do cometa modificado. Observa-se que, nas linhagens SK-Mel 19 e 28, em todas as concentrações testadas a biflorina foi estatisticamente diferente dos controles negativos, mas semelhante ao controle positivo, inibindo, portanto a metilação. Por outro lado, na SK-mel 103, a biflorina não apresentou atividade na metilação do DNA.

A biflorina a 5 μM apresentou, aproximadamente, índice de dano (ID) no cometa alcalino 1,4 vezes menor em comparação ao controle negativo (DMSO). Em relação as linhagens celulares, a biflorina causou ID médio a 5 μM de $190,33 \pm 5,93$ na SK-Mel 19 , $156,17 \pm 10,43$ na SK-Mel 28, e $179,83 \pm 5,67$ na SK-Mel 103. Tais índices foram semelhantes aos encontrados no tratamento com 5-azacitidina (5-AZA) a 10 μM . Sendo assim, o ID causado após o tratamento com 5-AZA para SK-Mel 19 foi de $159,17 \pm 18,58$, $120,50 \pm 7,00$ para a SK-Mel 28, e $124,75 \pm 2,25$ para a SK-Mel 103, sendo este: 1,51; 2,00 e 1,67 vezes menor que o seu controle negativo (ST-sem tratamento).

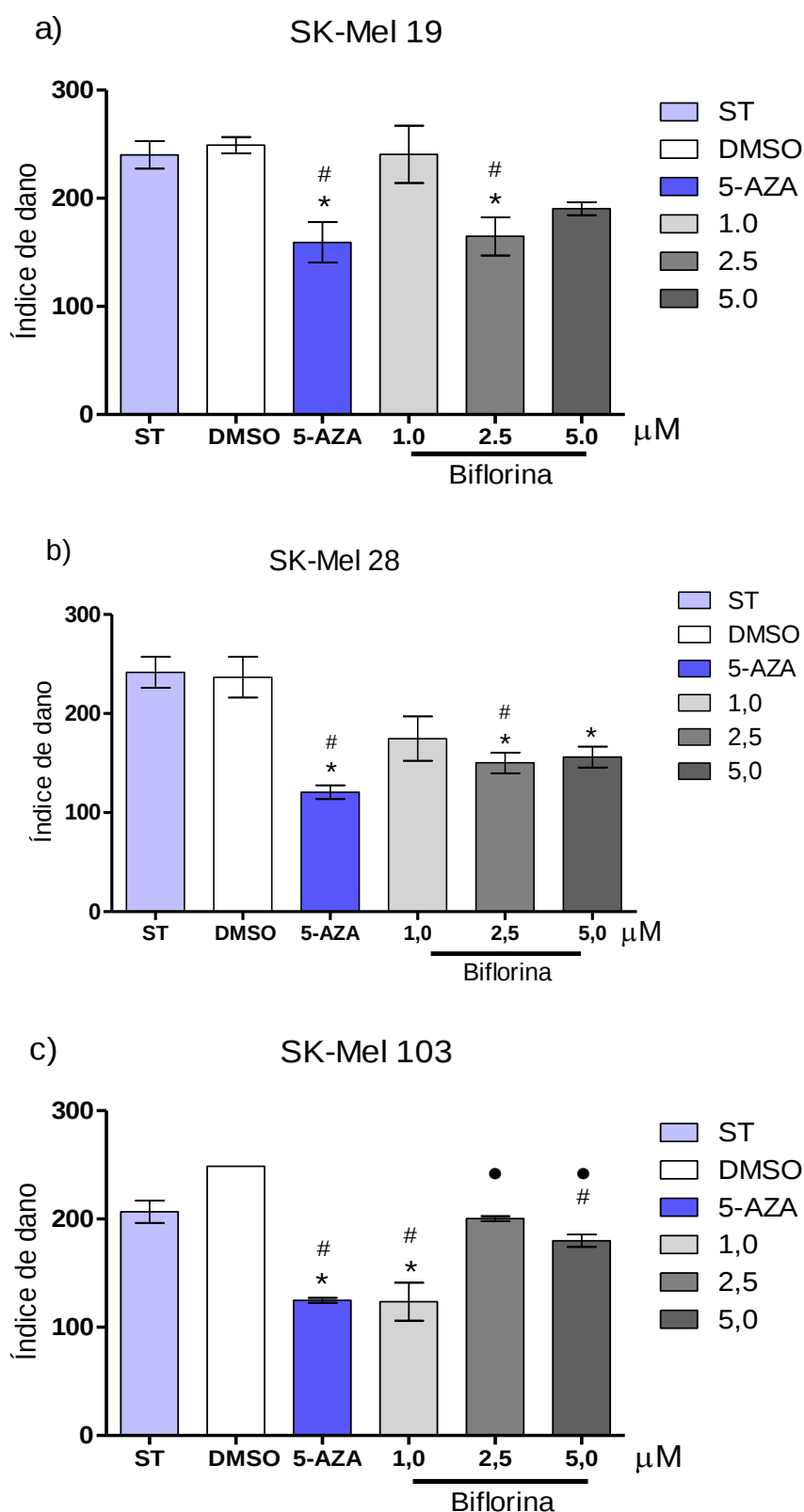


Gráfico 14 -Índice de Dano causado pela biflorina 1,0, 2,5 e 5,0 μM e 5-azacitidina (5-aza) 10 μM nas SK-Mel 19, 28 e 103 após 24h de tratamento (a) SK-Mel 19; (b) SK-Mel 28; (c) SK-Mel 103. Para o índice de dano usou-se ANOVA *oneway* seguido do teste de Tukey (*Multiple Comparison Test*). Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$, sendo * comparação com o sem tratamento (ST); # comparação com o DMSO; • comparação com 5-azacitidina.

5.5 Análise da expressão de genes por RT-PCR

5.5.1 Expressão dos genes de progressão do ciclo celular, replicação do DNA e reparo

Foi realizado a quantificação relativa da expressão do gene de progressão do ciclo celular *MELK*, replicação do DNA *TYMS*, e reparo *RAD* e *MGMT* nas linhagens SK-Mel 19, 28 e 103, respectivamente.

Na linhagem SK-Mel 19 (gráfico 15), os genes analisados apresentaram sua expressão gênica diminuída em todas as concentrações de biflorina, sendo estatisticamente significativos em relação ao controle negativo. Entretanto, a diminuição da expressão não depende diretamente da concentração.

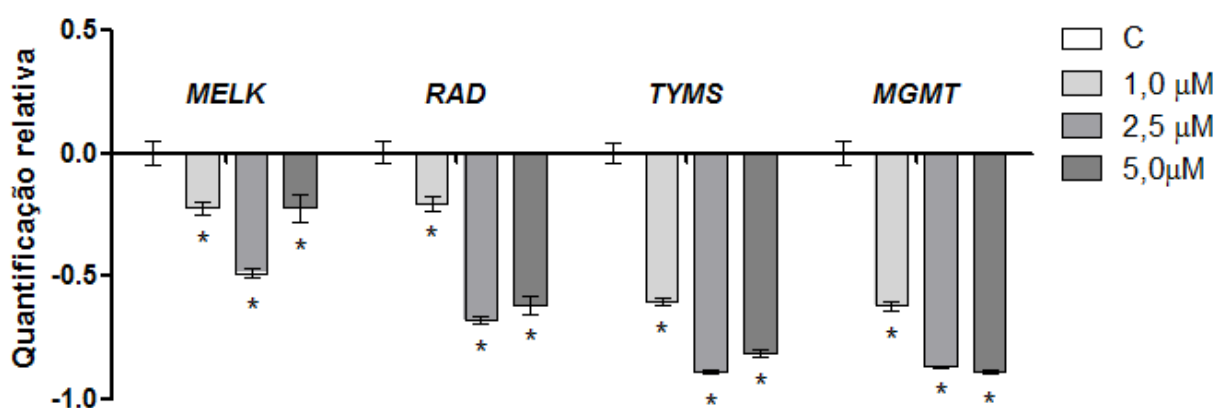


Gráfico 15 - Quantificação relativa da expressão dos genes *MELK*, *RAD*, *TYMS* e *MGMT* após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μM nas células **SK-Mel 19** por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA twoway seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com *p < 0,05 em relação ao controle negativo.

No tratamento da linhagem SK-Mel 19 com biflorina 5,0 μM obteve-se os valores de RQ_{médio} para *MELK* de $0,780 \pm 0,056$, para *RAD* $0,383 \pm 0,041$, para *TYMS* $0,188 \pm 0,012$ e para *MGMT* $0,114 \pm 0,008$.

Na linhagem SK-Mel 28 (gráfico 16), houve redução na expressão gênica de *MELK*, estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, no tratamento com 5,0 μM de

biflorina ($RQ_{\text{médio}} 0,309 \pm 0,024$). Os genes *RAD*, *TYMS* e *MGMT* apresentaram expressão aumentada após tratamento com 1,0 μM de biflorina ($RQ_{\text{médio}} 2,294 \pm 0,141$; $RQ_{\text{médio}} 1,792 \pm 0,115$; $RQ_{\text{médio}} 1,935 \pm 0,132$, respectivamente). Enquanto que nas outras concentrações, *RAD* e *TYMS* não sofreram alteração na expressão e *MGMT* apresentou aumento na expressão tratando com biflorina 5,0 μM ($RQ_{\text{médio}} 10,418 \pm 0,673$).

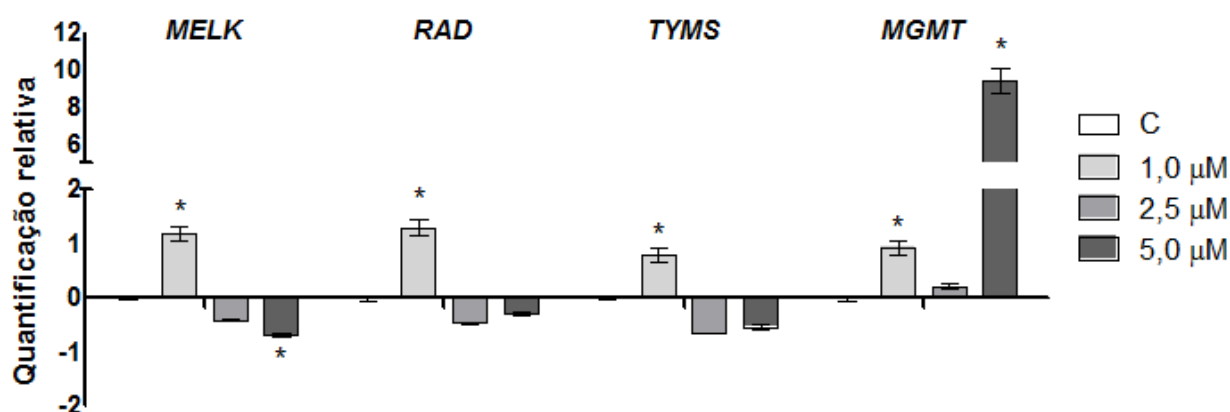


Gráfico 16 - Quantificação relativa da expressão dos genes *MELK*, *RAD*, *TYMS* e *MGMT* após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μM nas células **SK-Mel 28** por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA twoway seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

Na linhagem SK-Mel 103 (gráfico 17), os genes *MELK*, *RAD* e *TYMS* apresentaram redução na expressão gênica após tratamento com biflorina a 1,0 μM ($RQ_{\text{médio}} 0,403 \pm 0,034$; $RQ_{\text{médio}} 0,328 \pm 0,020$; $RQ_{\text{médio}} 0,312 \pm 0,020$, respectivamente). No entanto, os genes *RAD* ($RQ_{2,5\mu\text{M}} 3,027 \pm 0,130$; $RQ_{5,0\mu\text{M}} 1,905 \pm 0,067$), *TYMS* ($RQ_{2,5\mu\text{M}} 2,552 \pm 0,104$; $RQ_{5,0\mu\text{M}} 1,565 \pm 0,053$) e *MGMT* ($RQ_{2,5\mu\text{M}} 1,779 \pm 0,194$; $RQ_{5,0\mu\text{M}} 1,939 \pm 0,091$) apresentaram aumento significativo da expressão nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM de biflorina. Entretanto, a diminuição da expressão não depende diretamente da concentração. Adicionalmente, a expressão do gene *MELK* não foi significativamente diferente do controle negativo no tratamento com biflorina nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM .

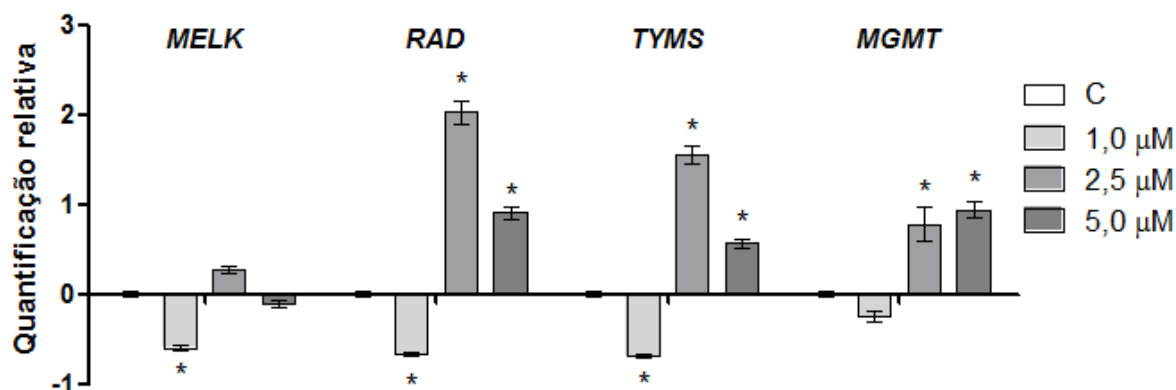


Gráfico 17 - Quantificação relativa da expressão dos genes *MELK*, *RAD*, *TYMS* e *MGMT* após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 µM nas células **SK-Mel 103** por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA *twoway* seguido do teste de Bonferroni. Consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

5.5.2 Expressão dos genes da metilação

Para determinar a influência do tratamento da biflorina sobre a expressão dos genes envolvidos na metilação do DNA, realizou-se o RT-PCR.

Na linhagem SK-Mel 19 (gráfico 18), os genes da metilação *DNMT1*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4* e *MeCP2* apresentaram redução na expressão gênica em todas as concentrações de biflorina testadas, sendo a diminuição da expressão diretamente proporcional à concentração da biflorina e estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, exceto na expressão de *MBD1* com biflorina a 1,0 µM.

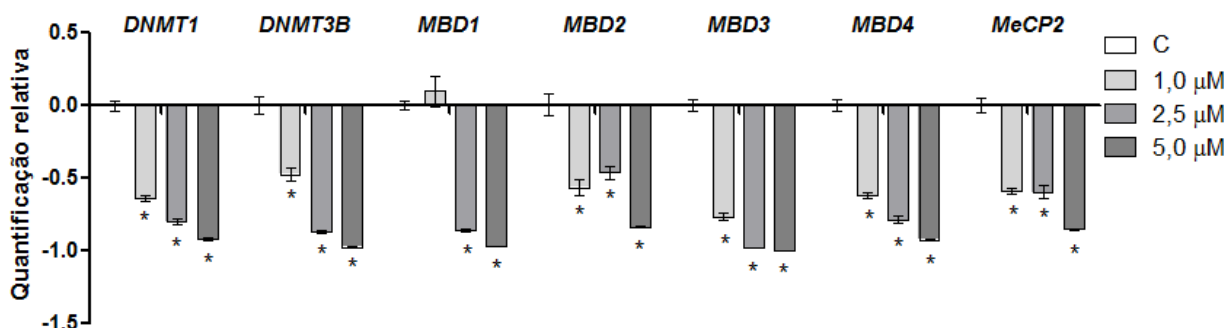


Gráfico 18 - Quantificação relativa da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4*, *MeCP2*, *MGMT* após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 µM nas células **SK-Mel 19** por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA *twoway* seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

No tratamento da linhagem SK-Mel 19 com biflorina 5,0 μ M obteve-se os valores de $RQ_{\text{médio}}$ para *DNMT1* de $0,084 \pm 0,010$, para *DNMT3B* $0,027 \pm 0,003$, para *MBD1* $0,032 \pm 0,003$, para *MBD2* $0,166 \pm 0,007$, para *MBD3* $0,005$, para *MBD4* $0,078 \pm 0,003$ e para *MeCP2* $0,151 \pm 0,005$.

Na linhagem SK-Mel 28 (gráfico 19), os genes da metilação *DNMT1*, *DNMT3B* e *MBD3* apresentaram redução na expressão gênica em todas as concentrações de biflorina testadas, sendo a diminuição da expressão diretamente proporcional à concentração da biflorina e estatisticamente significativa em relação ao controle negativo. Por outro lado, os genes *MBD2* e *MeCP2* apresentaram diminuição significativa apenas nas concentrações de 2,5 e 5,0 μ M, e a expressão de *MBD1* não foi alterada durante o tratamento.

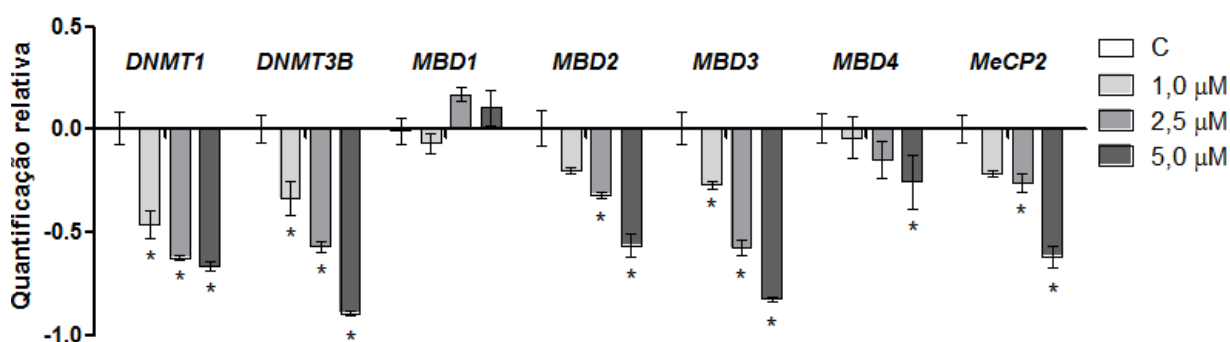


Gráfico 19 - Quantificação relativa da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4*, *MeCP2*, *MGMT* após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μ M nas células **SK-Mel 28** por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA two-way seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

No tratamento da linhagem SK-Mel 28 com biflorina (5,0 μ M) obteve-se os valores de $RQ_{\text{médio}}$ para *DNMT1* de $0,336 \pm 0,024$, para *DNMT3B* $0,106 \pm 0,010$, para *MBD1* $1,105 \pm 0,087$, para *MBD2* $0,436 \pm 0,055$, para *MBD3* $0,174 \pm 0,012$, para *MBD4* $0,744 \pm 0,130$ e para *MeCP2* $0,383 \pm 0,054$. Realçando que o gene *DNMT3B*, o de menor RQ, apresentou 9 vezes menos expressão gênica em relação ao controle negativo. Além disso, a biflorina causou diminuição na expressão gênica de *DNMT1*, *DNMT3B*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4* e *MeCP2* de forma concentração dependente.

Na linhagem SK-Mel 103 (gráfico 20), os genes *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD3* e *MeCP2* apresentaram aumento da expressão gênica na concentração de 1,0 μM de biflorina e redução da expressão nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM , por outro lado, os genes *DNMT1* e *MBD2* não tiveram suas expressões modificadas e o gene *MBD4* teve aumento de expressão em 1,0 e 2,5 μM , mas não em 5,0 μM .

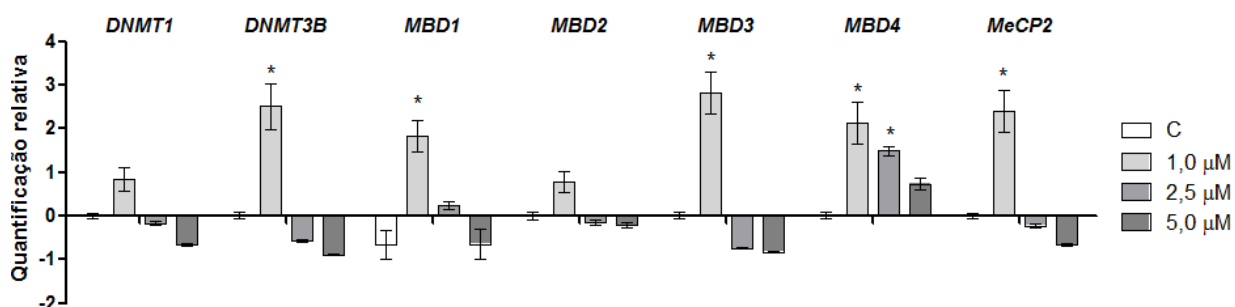


Gráfico 20 - Quantificação relativa da expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4*, *MeCP2*, *MGMT* após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μM nas células **SK-Mel 103** por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA *twoway* seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

No tratamento da linhagem SK-Mel 103 com biflorina (5,0 μM) obteve-se os valores de $RQ_{\text{médio}}$ para *DNMT1* de $0,347 \pm 0,031$, para *DNMT3B* $0,106 \pm 0,010$, para *MBD1* $1,063 \pm 0,000$, para *MBD2* $0,796 \pm 0,055$, para *MBD3* $0,174 \pm 0,024$, para *MBD4* $1,733 \pm 0,129$ e para *MeCP2* $0,342 \pm 0,041$. Realçando que o gene *DNMT3B*, o de menor RQ, apresentou 9 vezes menos expressão gênica em relação ao controle negativo.

5.5.3 Expressão gênica do *BRAF*

Quanto a expressão gênica do gene *BRAF*, na linhagem SK-Mel 19 (gráfico 21) foi observada redução da expressão apenas na concentração de 1,0 μM ($RQ_{\text{médio}}$ $0,582 \pm 0,020$) e 2,5 μM ($RQ_{\text{médio}}$ $0,403 \pm 0,016$), enquanto que a 5,0 μM ($RQ_{\text{médio}}$ $1,833 \pm 0,146$) houve aumento significativo ($*p < 0,05$) (gráfico 21).

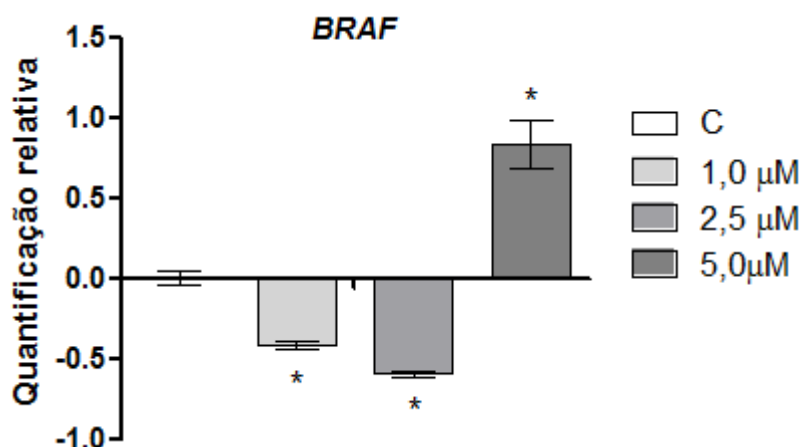


Gráfico 21 - Quantificação relativa da expressão do gene *BRAF* após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μM nas células **SK-Mel 19** por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA *twoway* seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

Na linhagem SK-Mel 28 (gráfico 22), foi observado aumento da expressão do gene *BRAF* após 24 horas de tratamento com 1,0 μM ($\text{RQ}_{\text{médio}} 4,386 \pm 0,234$) e 5,0 μM ($\text{RQ}_{\text{médio}} 3,336 \pm 0,190$) de biflorina sendo significativo ($*p < 0,05$) em relação ao controle negativo, enquanto que na concentração de 2,5 μM , a expressão permaneceu semelhante ao controle negativo.

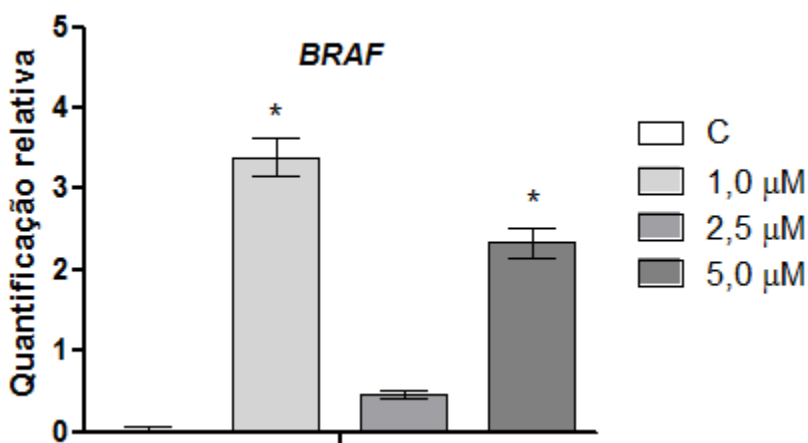


Gráfico 22 - Quantificação relativa da expressão do gene *BRAF* após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μM nas células **SK-Mel 28** por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA *twoway* seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

Na linhagem SK-Mel 103 (gráfico 23), foi observado aumento significativo da expressão do gene *BRAF* após o tratamento com biflorina nas concentrações de 2,5 e 5,0 μM ($\text{RQ}_{\text{médio}}$ 2,305 $\pm$ 0,105; $\text{RQ}_{\text{médio}}$ 2,156 $\pm$ 0,074, respectivamente) em relação ao controle negativo. No entanto, não foi observado diferença estatística na concentração de 1,0 μM ($\text{RQ}_{\text{médio}}$ 1,052 $\pm$ 0,049).

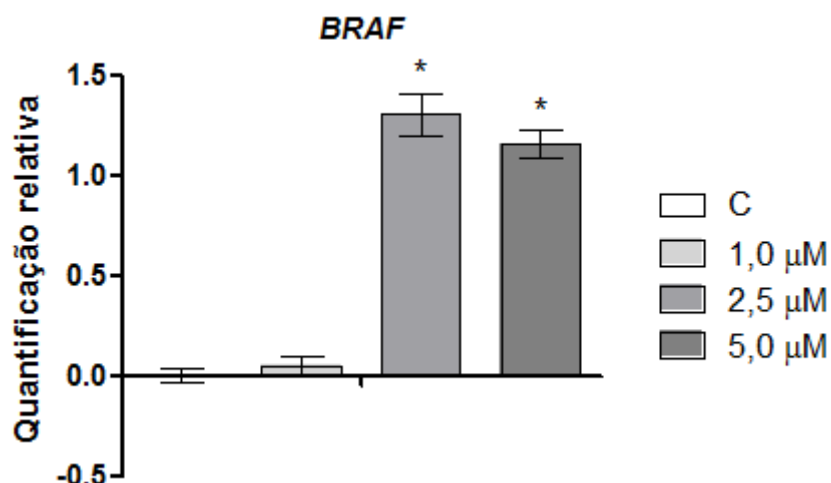


Gráfico 23 -Quantificação relativa da expressão do gene *BRAF* após tratamento com biflorina a 1,0, 2,5 e 5,0 μM nas células **SK-Mel 103** por 24h. Para análise estatística usou-se ANOVA *twoway* seguido do teste de Bonferroni. Considerou-se estatisticamente significativos os resultados com $*p < 0,05$ em relação ao controle negativo.

6 DISCUSSÃO

Quinonas continuam sendo uma das maiores famílias de agentes antitumorais (RAJASEKAR et al., 2012). Quinonas e naftoquinonas de ocorrência natural e seus análogos são compostos citotóxicos importantes. É o caso, por exemplo, das quinonas dactinomicina, antraciclinas (daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina e mitoxantrona), bleomicinas e mitomicina-C, que têm sido usadas clinicamente para o tratamento do câncer, e das naftoquinonas lapachol e β -lapachona. Tais substâncias agem no ciclo redox da célula levando ao estresse oxidativo; ou atuam como agentes intercalantes de DNA; ou como inibidores de enzimas essenciais para duplicação ou biossíntese de nucleotídeos (SALUSTIANO et al., 2010; SUNASSEE et al., 2013).

A Biflorina, uma o-naftoquinona isolada das raízes de *Capraira biflora* L, demonstra atividade antitumoral promissora (VASCONCELLOS et al., 2007). Estudos prévios demonstraram sua citotoxicidade contra diversas linhagens tumorais (MCF-7, MDA-MB-231, MX1, CEM, HL-60, K 562, NCIH266, NCIH23, PC-3, SF295, HCT-8, ACP-02, AGP-01) inclusive linhagens de melanoma murinho (B16) e humano (UACC-62, UACC-257, MDA-MA-435, M14) (VASCONCELLOS et al., 2005, 2011). Adicionalmente, a atividade antitumoral *in vivo* contra tumores de Erlich, Sarcoma 180 e melanoma murinho B16 também foi descrita (VASCONCELLOS et al., 2011). Associado a estas atividades, a Biflorina possui comprovada ação antioxidante, imunoestimulante, genotóxica e não-mutagênica (VASCONCELLOS et al., 2005, 2007).

O estudo atual propôs identificar a ação da Biflorina contra células de melanoma humano verificando a citotoxicidade, as mudanças morfológicas, o tipo de morte celular, a capacidade de fragmentação do DNA, inibição da metilação do DNA e/ou alterações nos genes da metilação *DNMT1*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4*, *MeCP2*, alteração na

expressão de genes de progressão do ciclo celular *MELK*, de replicação do DNA *TYMS*, de reparo *RAD* e *MGMT* e o oncogene *BRAF*.

Para a avaliação preliminar da viabilidade celular ou citotoxicidade utilizou-se o Alamar Blue[®]. Por meio deste, após 24 horas de tratamento, a biflorina apresentou as CI_{50} de 2,32 μ M (IC_{95} 1,94-2,77) para a SK-Mel 19, 9,20 μ M (IC_{95} 6,89-12,36) para a SK-Mel 28 e 1,85 μ M (IC_{95} 1,62-2,10) para a SK-Mel 103. De forma complementar, no ensaio de exclusão por azul de Tripán, após 24h de tratamento e na maior concentração testada (5,0 μ M) as porcentagens de células vivas na SK-Mel 19 foi de 70,89% $\pm$ 7,65, na SK-Mel 28 94,33% $\pm$ 1,70, e na SK-Mel 103 66,22% $\pm$ 10,45. Sendo assim confirma-se a viabilidade celular acima de 60% em 24 horas de tratamento, o que viabilizou os experimentos seguintes.

Conforme Vasconcellos e colaboradores (2011) e Montenegro e colaboradores (2013), a Biflorina possui capacidade citotóxica contra melanoma murinho B16 (CI_{50} 16,86 μ M) e melanoma humano nas linhagens M14 (CI_{50} 7,02 μ M), UACC-257 (CI_{50} 4,44 μ M), UACC-62 (CI_{50} 5,01 μ M) e MDA-MB-435 (CI_{50} 2,10 μ M). Sendo assim, os valores das CI_{50} das SK-Mel são semelhantes ao encontrado na linhagem MDA-MB-435 (MONTENEGRO et al., 2013b; VASCONCELLOS et al., 2011).

Em relação a outras quinonas, a biflorina mostrou-se mais ativa em melanoma. O sesquiterpeno quinona derivado da linhagem F00120 do gênero *Penicillium*, encontrada no solo marinho, é citotóxica contra linhagens de melanoma A375 e B16, CI_{50} 22,88 e 27,37 μ g/mL, respectivamente (LIN et al., 2012). Já em Massaoka e colaboradores (2012) mostram as CI_{50} da quinona jacaranone [metil (1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexandienyl) acetato] de 23 μ M na SK-Mel 28, 30 μ M na A2058 (melanoma humano) e 17 μ M na B16F10-Nex2 (melanoma murinho) (MASSAOKA et al., 2012).

Durante a análise da morfologia das SK-Mel após tratamento por 24 horas com biflorina, observou-se que a mesma causou citólise com aumento de restos celulares dispersos, vacuolização do citoplasma, desarranjo da cromatina, o que segundo Takano (2010) sugere caracterizar a indução de apoptose.

Mudanças morfológicas causadas pela biflorina também foram observadas por Vasconcellos e colaboradores (2011) em células de melanoma murinho B16 por coloração com hematoxilina-eosina em que, em todas as concentrações testadas (3,95, 7,89 e 15,79 μM), as células apresentaram morfologia consistente com apoptose tais como redução de volume, condensação da cromatina e fragmentação do núcleo (VASCONCELLOS et al., 2011).

Corroborando com o indicativo de indução da apoptose, realizou-se a coloração diferencial laranja de acridina e brometo de etídio. As análises das células tratadas com biflorina por 24, 48 e 72 horas, realizadas através da coloração com a mistura LA/BE a 100 $\mu\text{g/mL}$, permitiu diferenciar as células em viáveis, apoptóticas e necróticas. Em todas as linhagens tratadas com biflorina (1,0 2,5 e 5,0 μM), foi observado um aumento no número de células apoptóticas a medida que houve o aumento na concentração de biflorina, entretanto, o número de células em necrose não variou, sempre comparado ao controle negativo.

Todas as SK-Mel tratadas com Doxorubicina a 5,0 μM apresentaram características apoptóticas, porém o mesmo não foi observado no tratamento com Dacarbazina a 5,0 μM , que apresentou perfil semelhante ao controle negativo. Em Vasconcellos e colaboradores (2011) a Biflorina também causou apoptose na linhagem de melanoma murino B16 nas concentrações de 7,89 e 15,79 μM . Nestas mesmas concentrações a biflorina causa diminuição da população celular na fase G_2/M do ciclo celular o que corrobora com fragmentação internucleossomal do DNA com consequente morte por apoptose (VASCONCELLOS et al., 2011).

De acordo com Rajasekar e colaboradores (2012), naftoquinonas isoladas do extrato de jichi de *Lithospermum erthrorhizon* Siebold & Zucc, LE) apresentam CI_{50} 2,73 μ g/mL em linhagem de melanoma B16F10 e 0,89 μ g/mL em linhagem de melanoma humano A375SM. Sua citotoxicidade está ligada a parada do ciclo celular na fase G1-S e G2-M e na regulação de proteínas apoptóticas, tais como a redução na expressão de Bid e aumento de Bax e Bad. De forma semelhante, Kretschmer e colaboradores (2012) naftoquinonas isoladas de *Onosma paniculata* Bureau & Franchet apresentaram CI_{50} nas linhagens isoladas de melanoma humano WM35, WM9 e WM164 de $2,3 \pm 0,1 \mu$ M, $2,7 \pm 0,3 \mu$ M, e $8,3 \pm 0,3 \mu$ M, respectivamente; além de induzir parada na fase G1-S e apoptose (KRETSCHMER et al., 2012). A proliferação celular é governada pelo ciclo celular e a habilidade dos agente quimioterápicos de induzir parada no ciclo celular e apoptose é importante para determinar sua relevância terapêutica (TSENG et al., 2002)

Montenegro e colaboradores (2010) demonstraram que Juglona (5-hidroxi-1,4-naftoquinona) e seus derivados apresentam CI_{50} variando entre 3,8-28,7 μ M contra linhagem de melanoma MDA-MB-435, superior ao encontrado no tratamento com biflorina, além disso, tais compostos foram capazes de causar mudanças morfológicas após coloração com hematoxilina-eosina, o que posteriormente indicou a indução de apoptose após coloração com laranja de acridina/brometo de etídio. Análises de fragmentação do DNA, externalização de fosfatidilserina, despolarização mitocondrial e ativação de caspases confirmaram a indução de apoptose por essas substâncias (MONTENEGRO et al., 2010). A biflorina, no entanto, apresentou CI_{50} próxima a das naftoquinonas isoladas de *O. paniculata* Bureau & Franchet e, de forma semelhante, também causou apoptose, porém outros métodos devem ser feitos para determinar qual a via da apoptose que está sendo ativada.

Comparando os tratamentos nas diferentes linhagens verifica-se que a célula mais susceptível à morte induzida pela Biflorina é a SK-Mel 103, seguida pelas SK-Mel 19 e 28,

sendo a 28 a mais resistente (gráfico 6). Tal comportamento pode ser justificado pelas características genéticas das células. Levando em consideração que a SK-Mel 19 e 103 possuem *TP53* selvagem, ou seja, o gene permanece com sua capacidade de parada no ciclo celular para reparo aos danos ou indução a apoptose quando necessário e, que a SK-Mel 28 possui *TP53* mutante, podendo burlar a indução da apoptose, reconhece-se que a Biflorina pode estar agindo em alguma via de sinalização paralela ao *TP53* por causar, além da diminuição da viabilidade das SK-Mel 19 e 103, também a morte da SK-Mel 28, sendo mais significativo utilizando 5,0 μ M de Biflorina e 72 horas de tratamento (MULLER; VOUSDEN, 2013).

Mayola e colaboradores (2011), ao comparar a atividade de witaferina (WFA) A contra células de melanoma cutâneo M14, Mel501, Lu1205 e SK-Mel 28, verificou que esta linhagem é mais resistente a indução da apoptose, possivelmente devido tanto a sua resistência a danos causados por radicais livres quanto a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (MAYOLA et al., 2011). A atividade de WFA resulta da elevação de espécies reativas de oxigênio. A atividade da biflorina, por outro lado, possui atividade antioxidante (VASCONCELLOS et al., 2005), sugerindo que a resistência da SK-Mel 28 a biflorina possa estar relacionada a expressão de proteínas antiapoptóticas tais como a Bcl-2.

Estudos recentes têm demonstrado que a desregulação de *TP53* no melanoma pode ocorrer pelo aumento na expressão de MDM4 (ligante de p53), cerca de 65% ocorrem nos estágios I-IV de melanoma. Tendo como alvo a via MDM4-p53, a inibição da formação deste complexo pode resultar em inibição do crescimento tumoral e sensibilização aos quimioterápicos, inclusive inibidores de *BRAF* (GEMBARSKA et al., 2012; WANGARI-TALBOT; CHEN, 2013).

A via de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK é altamente conservada e tem importante papel nas neoplasias melanocíticas. A ativação dessa via nos melanócitos cutâneos pode ocorrer por vários mecanismos, tais como: estimulação autócrina de fatores de crescimento e mutações nos oncogenes *NRAS* e *BRAF*. A proteína RAS ativa numerosas cascatas de sinalização envolvidas no controle do crescimento celular. A interação de RAS com BRAF causa a transdução de sinais regulatórios para MEK1/2, que consecutivamente, fosforila ERK1/2, levando a ativação dessas quinases que ativam diversos fatores de transcrição de forma a regular expressão gênica, metabolismo, morfologia celular e determinar diversas respostas celulares de proliferação, diferenciação, senescência e sobrevivência (BLOETHNER et al., 2009; GOEL et al., 2006; HEIDORN et al., 2010).

A mutação do gene *BRAF* exerce muitos efeitos oncogênicos levando ao descontrole no crescimento das células de melanoma (FEDORENKO; PARAISO; SMALLEY, 2011). Levando-se em consideração a mutação do gene *BRAF* na região V⁵⁹⁹E nas linhagens SK-Mel 19 e 28, ressalta-se que a biflorina foi capaz de diminuir a expressão de *BRAF* nas concentrações de 1,0 μ M e 2,5 μ M na SK-Mel 19, porém houve aumento da expressão na SK-Mel 28 e 103. Tal comportamento pode ser justificado pelo fato de a SK-Mel 28 apresentar mutação em *TP53* enquanto que a SK-Mel 103 apresenta mutação em *NRAS*, o que são mutuamente excludentes já que a mutação Q61K em *NRAS* coopera para a perda da p53 na geração do melanoma (DOVEY; WHITE; ZON, 2009).

De forma intrigante, a análise do conjunto de resultados da linhagem SK-Mel 103, verifica-se sua maior susceptibilidade a diminuição da viabilidade celular e morte por apoptose. Por outro lado, a mesma linhagem, ao contrário das outras, apresentou aumento na expressão do gene *BRAF*, além de ter aumentado a expressão dos genes *RAD*, *TYMS* e *MGMT* e não ter sofrido influência na expressão de genes da metilação.

É conhecido que muitos genes específicos no câncer que afetam o controle do crescimento celular são hipermetilados e epigeneticamente silenciados. O oncogene *RAS* silencia diretamente um complexo envolvendo 28 componentes efetores do silenciamento epigenéticos de *RAS*, incluindo a DNMT1 (GAZIN et al., 2007). A inibição da proteína Ras obriga o aumento dos níveis da proteína DNMT1 e restringe a hipermetilação global do DNA, apontando o envolvimento da via de sinalização da Ras com alterações no padrão de metilação durante os eventos iniciais da transformação maligna associado ao estresse sustentado (MOLOGNONI et al., 2013). A identificação de novos componentes que agem inibindo *RAS* e, que são requeridos para o silenciamento epigenéticos e completa transformação maligna, são potenciais alvos para a terapia do câncer.

Muitos genes supressores de tumor se tornam hipermetilados no câncer devido, geralmente, ao aumento na expressão do gene *DNMT1* (WU et al., 1993). Sendo assim, supõe-se que a ativação da via de sinalização do RAS/BRAF, representada pelo aumento na expressão de *BRAF* e mutação de *NRAS* na linhagem SK-Mel 103, pode estar envolvida com a reprogramação epigenética em resposta aos danos ao DNA causados pela biflorina, já que não houve diminuição na expressão dos genes da metilação, diferentemente do encontrado nas outras linhagens celulares analisadas. Sustentando essa hipótese, alguns autores demonstram que danos intracelulares, tais como aumento de níveis de radicais livres, induzem morte celular e modificações em genes responsáveis pela metilação do DNA (MOLOGNONI et al., 2013).

Associada proliferação descontrolada inerente as células neoplásicas, há a progressão do ciclo celular e a indução do aumento na replicação do DNA (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Para manter o equilíbrio entre proliferação e sobrevivência o gene *MELK* age na regulação do ciclo celular, proliferação celular e apoptose. Adicionalmente, a proteína MELK interage fisicamente com p53 e contribui para a apoptose dependente de p53 e parada do ciclo

celular (JIANG; ZHANG, 2013). De forma complementar, o gene *TYMS* também está relacionado a proliferação e regulação do ciclo celular (KOTOULA et al., 2012). Sendo assim, após o tratamento com biflorina em duas linhagens de SK-Mel estudadas, ocorreu a diminuição na expressão de *MELK* e *TYMS*. Na linhagem SK-Mel 103 essa diminuição não foi observada, o que pode justificar parcialmente a indução de inviabilidade celular por apoptose.

A importância biológica dos danos ao DNA é evidenciada pelo largo cometimento da proteção do genoma quanto a integridade da informação, tal como as redes de genoproteção incluem sequestradores eletrofílicos, complexos de recombinação que permite a tolerância a lesões no DNA, polimerases especializadas que ultrapassa a lesão e uma grande bateria de proteínas de reparo do DNA. Perda de uma ou mais dessas ferramentas resultam na perda da integridade informacional e, por fim, o início da doença (SHRIVASTAV; LI; ESSIGMANN, 2010). Portanto, ensaios que caracterizem danos induzidos ao DNA, tais como os de genotoxicidade, são importantes nessa avaliação.

A biflorina causou tanto quebras de fita simples quanto quebras de fita dupla de DNA pelo ensaio do cometa. Comparando-se o índice de dano entre as linhagens testadas, tanto no cometa alcalino quanto no neutro, observou-se que as linhagens SK-Mel 19 e 28, e 28 e 103 apresentam índice de dano estatisticamente diferentes. Tal resultado corrobora tanto com os resultados da citotoxicidade e da coloração laranja de acridina-brometo de etídio, em que se visualiza uma maior sensibilidade das linhagens SK-Mel 19 e 103 e, maior resistência da linhagem SK-Mel 28. O dano existente pode ser justificado pelo fato da biflorina ter a capacidade de interagir com o DNA e causar apoptose, conforme visualizado pela laranja de acridina-brometo de etídio.

Compostos quinoides policíclicos, tais como naftoquinonas e antraquinonas, comumente produzem quebras na fita de DNA, e essa interação ao DNA (intercalado ao DNA ou alquilação) pode contribuir para a citotoxicidade. O derivado clorado da 2-hidroxi-3-(aminometil)-1,4-naftoquinona, apresentou CI_{50} 6,4 μ M após tratar a linhagem de melanoma MDA-MB-435, sendo justificada a baixa CI_{50} devido aos níveis significantes de quebras de DNA que resultou em dano irreparável e consequente indução de morte celular (NEVES et al., 2013). Tal comportamento é bastante semelhante ao da biflorina no tratamento das linhagens SK-Mel apresentadas no presente estudo.

Bai e colaboradores (2010), analisando uma série de bis(catecol) derivados de amônio quaternário, demonstraram que tais substâncias sintéticas induziram citotoxicidade em linhagem de melanoma B16F1 com CI_{50} de $7,29 \pm 0,75 \mu$ M através da formação de bis(o-quinona) com consequente formação de ligação cruzada com o DNA via oxidação tirosinase-dependente presente na célula (BAI et al., 2010). A formação de ligações cruzadas com o DNA causa bloqueio na replicação e transcrição, exigindo reparo, e caso não sejam removidas, promovem quebras cromossômicas, rearranjos e morte celular (MUNIANDY et al., 2011). A biflorina, de forma semelhante, possivelmente está induzindo citotoxicidade por interação direta com o DNA, formação de ligações cruzadas e/ou DSB que foram detectados no cometa alcalino e neutro.

A integridade do genoma enfrenta agressões de vários tipos, de forma que mecanismos eficientes de reparo são constantemente ativados para que tal dano não cause inviabilidade celular. Considerando que em 3 horas de tratamento a biflorina causa fragmentação do DNA, detectada pelo cometa, mas que em 24 horas a viabilidade celular é maior que 80% e a indução de apoptose é menos expressiva que nos outros tempos de tratamento, deduziu-se estar havendo a ativação de genes de reparo.

De acordo com os resultados obtidos na expressão dos genes de reparo *RAD* e *MGMT*, observa-se diminuição da expressão na SK-Mel 19, diferentemente das linhagens SK-Mel 28 e 103, em que ocorreu aumento na expressão desses genes. Estudos genéticos mostram que a perda de vias de reparo *RAD* dependentes comprometem a eficiência do reparo e a deleção de *RAD51*, *RAD54*, *RAD55* ou *RAD57* resulta em elevada utilização das vias de anelamento de fita simples, que ocorre pela anelamento da fita simples complementar seguido pela remoção da fita heteróloga e ligação dos espaços vazios (WU; KANTAKE; KOWALCZYKOWSKI, 2008). Tal redução de expressão de genes de reparo pela SK-mel 19 justifica sua maior susceptibilidade a morte.

O gene *MGMT* é chave para a defesa contra agentes alquilantes, sendo importante para a elucidação dos seus efeitos genotóxicos, que geralmente causam o aumento da sua expressão mediando a proteção do genoma (KAINA et al., 2007). Entretanto, a presença de mutação no gene *KRAS* em tumores malignos está correlacionada com a inativação epigenética de *MGMT*, mostrando forte associação entre a inativação de *MGMT* pela hipermetilação e aparecimento de mutação G-A em *KRAS*, reforçando o fato de a hipermetilação/inativação de *MGMT* estar relacionado com o controle do câncer, pelo aumento de respostas parciais e estabilização da doença (AMATU; SARTORE-BIANCHI; MOUTINHO, 2013; ESTELLER et al., 2000).

Associada à diminuição na expressão de genes de reparo, a biflorina também reduziu significativamente a expressão de genes envolvidos na maquinaria de metilação de DNA: *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD4* e *MeCP2*. Dar-se importância a tal fato ao se considerar que as ilhas CpG da região promotora de genes supressores tumorais e genes de reparo frequentemente encontram-se hipermetiladas em câncer.

As alterações epigenéticas são potencialmente reversíveis, diferentemente das alterações genéticas. Desse modo, estudos que avaliam o perfil epigenético de tumores, complementares aos modelos genéticos, constituem uma poderosa ferramenta para um melhor entendimento dos mecanismos de ação de substâncias com potencial terapêutico. Vários trabalhos têm demonstrado a expressão de genes silenciados por metilação por meio de agentes desmetilantes como 5-aza-2-deoxicitidina, 5-azacitidina ou zebularina. Atualmente, o uso em baixa dosagem dessas drogas tem mostrado uma significativa atividade antitumoral e a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso de 5-azacitidina como tratamento eletivo para doenças pré-leucêmicas e síndromes mielodisplásicas (ESTELLER, 2006).

Essa área continua sendo interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de medicamentos menos tóxicos e de maior especificidade contra o câncer. Por outro lado, a detecção da hipermetilação está relacionada com a piora do prognóstico e pode ser usado para monitorar o desenvolvimento de resistência a quimioterapia (GREENBERG et al., 2014).

No presente trabalho, para detectar o nível global de DNA metilado em células únicas, as células de melanoma estudadas foram expostas à Biflorina e ao agente 5-AZA, e posteriormente tratadas com a enzima de restrição HpaII com sítio alvo na metilação dos nucleotídeos CpG.

A diferença de sensibilidade à metilação do DNA da endonuclease de restrição HpaII foi usada no cometa modificado considerando-se que: alto nível de metilação dos dinucleotídeos CpG resultam em aumento na quantidade de DNA na calda do cometa nos nucleóides digeridos com HpaII. Teoricamente a porcentagem de cauda do DNA no caso do tratamento com HpaII representa todos os sítios de CCGG metilados no DNA das células. O dano ao DNA prioritário ao tratamento enzimático representa a quantidade de DNA da amostra digerida (WENTZEL et al., 2010).

Associada à diminuição da expressão dos genes da metilação nas linhagens SK-Mel 19 e 28, também houve inibição da metilação pela Biflorina em todas as concentrações testadas. Tal resultado é de grande importância ao se considerar que a azacitidina melhora significativamente a sobrevida de pacientes em comparação com a maioria dos regimes terapêuticos convencionais (SEYMOUR et al., 2010).

Assim como as vias de sinalização da apoptose, do dano e do reparo do DNA parecem ser determinantes nas respostas celulares aos tipos de agentes citotóxicos que podemos usar no tratamento dos tumores, como a biflorina, os resultados aqui apresentados podem apontar novas formas mais efetivas de tratar tumores. Semelhantemente, vias de reparo aos danos ao DNA parecem ser os maiores protetores do desenvolvimento do câncer. O estudo dessas vias pode levar a novas abordagens terapêuticas para a redução do desenvolvimento tumoral. O advento do tratamento guiado pelas características genéticas do câncer tem levado ao avanço na terapia, melhorando as taxas de sobrevida e limitando a toxicidade dos medicamentos.

7 CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A partir de 48 horas de tratamento com biflorina a 5,0 μM houve citotoxicidade extensa nas linhagens SK-Mel 19 e 103, de forma concentração e tempo dependentes. Entretanto, a associação da mutação *TP53* e *BRAF* na linhagem SK-Mel 28 foi significativa na resistência a morte após tratamento com biflorina, mesmo a 5,0 μM e após 72 horas de tratamento, quando comparado ao mesmo tratamento nas outras linhagens, tal resultado realça o papel do gene *TP53* mutado como importante fator de resistência a morte celular;
- Em comparação a outras quinonas, a biflorina apresentou citotoxicidade superior em melanoma, destacando-se a CI_{50} de 1,85 μM (IC_{95} 1,62-2,10) na SK-Mel 103 após 24 horas de tratamento;
- A morte celular por apoptose induzida pela biflorina de forma concentração e tempo dependentes, associada a fragmentação do DNA, causando tanto quebras de fita simples quanto dupla de DNA pelo ensaio do cometa, se mostram importantes para determinar o nível de interação da biflorina com o DNA;
- De modo particular, a mutação em *NRAS* na SK-Mel 103 não influenciou na citotoxicidade da biflorina, tornando esta linhagem a mais suscetível a ação dessa substância, quando comparado as outras SK-Mel. Por outro lado, após tratamento com biflorina em 2,5 μM e 5,0 μM , a SK-Mel 103 apresentou aumento na expressão de *RAD*, *TYMS*, *MGMT* e *BRAF*, entretanto não houve alteração na expressão dos genes envolvidos na metilação nem inibição da metilação pelo cometa modificado, sugerindo uma reprogramação epigenética em resposta aos danos ao DNA;
- A biflorina foi capaz de alterar genes envolvidos nas vias de sinalização MAPK e de apoptose, tais como *NRAS* e *BRAF*;

- De forma complementar ao que já era conhecido da ação da biflorina, o mecanismo de ação da mesma não envolve apenas a indução de morte por ação direta no DNA, mas também pela capacidade de interagir com a maquinaria epigenética relacionadas a metilação do DNA.

O presente estudo contribuiu para o conhecimento mais aprofundado do mecanismo de ação da biflorina de forma a promover sua utilização futura na terapia do câncer. Além disso, suscitou futuras investigações quanto ao mecanismo de morte por apoptose verificando as alterações de proteínas envolvidas nesse processo, além da verificação da influência em mecanismos epigenéticos específicos.

8 FINANCIAMENTO

Esta dissertação de mestrado foi financiada pelo projeto aprovado no Edital Universal nº 14/2012 da agência financiadora CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

9 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

[illegible]

10 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, S. L. et al. Analgesic properties of *Capraria biflora* leaves aqueous extract. **Fitoterapia**, v. 74, n. 7-8, p. 686–688, dez. 2003.
- ADJEI, A. A. Blocking Oncogenic Ras Signaling for Cancer Therapy. v. 93, n. 14, 2001.
- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211–24, 15 abr. 1994.
- ALLEN, R. T.; HUNTER, W. J.; AGRAWAL, D. K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 37, n. 4, p. 215–28, jun. 1997.
- ALMEIDA, V. L. DE et al. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO Vera Lúcia de Almeida, Andrei Leitão, Luisa del Carmen Barrett Reina, Carlos Alberto Montanari e Claudio Luis Donnici*. v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- AMATU, A.; SARTORE-BIANCHI, A.; MOUTINHO, C. Promoter CpG Island Hypermethylation of the DNA Repair Enzyme MGMT Predicts Clinical Response to Dacarbazine in a Phase II Study for Metastatic Colorectal Cancer Promoter CpG Island Hypermethylation of the DNA Repair. 2013.
- ANDRADE, A. et al. Inhibition of metastatic potential of B16-F10 melanoma cell line in vivo and in vitro by bi fl orin. **Life Sciences**, v. 93, n. 5-6, p. 201–207, 2013.
- ANDREOLI, F. et al. Modulation of Epigenetic Targets for Anticancer Therapy : Clinicopathological Relevance , Structural Data and Drug Discovery Perspectives. p. 578–613, 2013.
- ANWAR, A.; NORRIS, D. A.; FUJITA, M. Ubiquitin proteasomal pathway mediated degradation of p53 in melanoma. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 508, n. 2, p. 198–203, 15 abr. 2011.
- AQUINO, T. M. DE; LIMA, C. S. D. A. *Capraria biflora* L. (Scrophulariaceae): uma Revisão. v. 25, n. 3, p. 460–467, 2006.
- BAI, M. et al. Highly selective suppression of melanoma cells by inducible DNA cross-linking agents: bis(catechol) derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 43, p. 15321–7, 3 nov. 2010.
- BALCH, C. M. et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199–206, 20 dez. 2009.
- BARBOSA, G. D. S. **Potencial anticâncer da Biflorina sobre células tumorais gástricas**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 13 out. 2011.
- BENNETT, D. C. How to make a melanoma : what do we know of the primary clonal events ? p. 27–38, 2008.

- BICHAKJIAN, C. K. et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. American Academy of Dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 5, p. 1032–47, nov. 2011.
- BLOETHNER, S. et al. Malignant Melanoma—a Genetic Overview. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 100, p. 38–51, nov. 2009.
- BOLLAG, G. et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 596–9, 30 set. 2010.
- CALDECOTT, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. v. 9, n. august, 2008.
- CHARTRAIN, I.; ROGHI, C.; PHILIPPE, M. Cell Cycle Regulation of pEg3 , a New Xenopus Protein Kinase of the KIN1 / PAR-1 / MARK Family. v. 338, p. 327–338, 2002.
- CHUNG, S.; NAKAMURA, Y. MELK inhibitor , novel molecular targeted therapeutics for human cancer stem cells. p. 1655–1656, 2013.
- COCKERELL, C. J. The pathology of melanoma. **Dermatologic clinics**, v. 30, n. 3, p. 445–68, jul. 2012.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New Horizons for Old Drugs and Drug Leads. **Journal of natural products**, v. 2, 5 fev. 2014.
- CURADO M. P., EDWARDS B., SHIN H. R., STORN H., FERLAY J., HEANUE M., B. P. Cancer Incidence in Five Continents. **IARC scientific publications**, v. IX, n. 160, 2007.
- DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–54, 27 jun. 2002.
- DE BRAUD, F. et al. Malignant melanoma. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 47, n. 1, p. 35–63, jul. 2003.
- DE SOUZA, C. F. et al. Mining gene expression signature for the detection of pre-malignant melanocytes and early melanomas with risk for metastasis. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e44800, jan. 2012.
- DE ZIO, D.; CIANFANELLI, V.; CECCONI, F. New insights into the link between DNA damage and apoptosis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 6, p. 559–71, 20 ago. 2013.
- DEMIERRE, M.-F.; SONDAK, V. K. Cutaneous melanoma: pathogenesis and rationale for chemoprevention. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 53, n. 3, p. 225–39, mar. 2005.
- DOVEY, M.; WHITE, R. M.; ZON, L. I. Oncogenic NRAS cooperates with p53 loss to generate melanoma in zebrafish. **Zebrafish**, v. 6, n. 4, p. 397–404, dez. 2009.
- ESTELLER, M. et al. Inactivation of the DNA Repair Gene O 6 - Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation Is Associated with G to A Mutations in K-ras in Colorectal Tumorigenesis Inactivation of the DNA Repair Gene O 6 - Methylguanine-DNA Methyltransferase. 2000.
- ESTELLER, M. The necessity of a human epigenome project. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 6, p. 1121–5, jun. 2006.

- FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37–59, fev. 1995.
- FEDORENKO, I. V; PARAISO, K. H. T.; SMALLEY, K. S. M. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. **Biochemical pharmacology**, v. 82, n. 3, p. 201–9, 1 ago. 2011.
- FIELDS, R. C.; COIT, D. G. Evidence-based follow-up for the patient with melanoma. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 20, n. 1, p. 181–200, jan. 2011.
- FISHER E., SHTIVELMAN K., T. FLAHERTY, D. E. **A Melanoma Molecular Disease Model | Cancer Commons**. Disponível em: <http://www.cancercommons.org/researchers-clinicians/melanoma/melanoma-model/#footnote_0_52>. Acesso em: 28 fev. 2014.
- FLAHERTY, K. T. Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 7 Pt 2, p. 2366s–2370s, 1 abr. 2006.
- FLAHERTY, K. T.; HODI, F. S.; BASTIAN, B. C. Mutation-driven drug development in melanoma. **Current opinion in oncology**, v. 22, n. 3, p. 178–83, maio 2010.
- FONSECA, A. M. et al. Total assignments of ^1H and ^{13}C NMR spectra of biflorin and bis-biflorin from *Capraria biflora*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1038–1040, dez. 2003.
- FURUTA, E. et al. Biochimica et Biophysica Acta Metabolic genes in cancer : Their roles in tumor progression and clinical implications. **BBA - Reviews on Cancer**, v. 1805, n. 2, p. 141–152, 2010.
- GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 41, n. 1, p. 45–60, jan. 2005.
- GARBE, C. et al. Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. **The oncologist**, v. 16, n. 1, p. 5–24, jan. 2011.
- GARBE, C. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2012. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 48, n. 15, p. 2375–90, out. 2012.
- GAZIN, C. et al. An elaborate pathway required for Ras-mediated epigenetic silencing. v. 449, n. October, p. 1–6, 2007.
- GEMBARSKA, A. et al. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. v. 18, n. 8, 2012.
- GIBSON, U. E.; HEID, C. A; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 995–1001, 1 out. 1996.
- GIL, M. et al. Cloning and expression of a cDNA encoding a novel protein serine / threonine kinase predominantly expressed in hematopoietic cells. v. 195, p. 295–301, 1997.
- GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental hematology**, v. 30, n. 6, p. 503–12, jun. 2002.

- GIULIETTI, A et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 386–401, dez. 2001.
- GOEL, V. K. et al. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. **The Journal of investigative dermatology**, v. 126, n. 1, p. 154–60, jan. 2006.
- GOLLAPUDI, B. B.; KRISHNA, G. Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation research**, v. 455, n. 1-2, p. 21–8, 20 nov. 2000.
- GREENBERG, E. S. et al. Epigenetic biomarkers in skin cancer. **Cancer Letters**, v. 342, n. 2, p. 170–177, 2014.
- GREMEL, G. et al. Identification and functional validation of therapeutic targets for malignant melanoma. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 72, n. 3, p. 194–214, dez. 2009.
- GRIEWANK, K. G. et al. New developments in biomarkers for melanoma. **Current opinion in oncology**, v. 25, n. 2, p. 145–51, mar. 2013.
- GUEZENNEC, X. LE et al. MBD2 / NuRD and MBD3 / NuRD , Two Distinct Complexes with Different Biochemical and Functional Properties. v. 26, n. 3, p. 843–851, 2006.
- HAMM, C. et al. Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a systematic review. **Cancer treatment reviews**, v. 34, n. 2, p. 145–56, abr. 2008.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 19-20, p. 894–901, out. 2008.
- HASSLER, M. R.; EGGER, G. Epigenomics of cancer - emerging new concepts. **Biochimie**, v. 94, n. 11, p. 2219–30, nov. 2012.
- HEIDORN, S. J. et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. **Cell**, v. 140, n. 2, p. 209–21, 22 jan. 2010.
- HENDRICH, B.; BIRD, A. Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins. 1998.
- HO, K. L. et al. Short Article MeCP2 Binding to DNA Depends upon Hydration at Methyl-CpG. p. 525–531, 2008.
- HUERTA, S. et al. Screening and detection of apoptosis. **The Journal of surgical research**, v. 139, n. 1, p. 143–56, 1 maio 2007.
- INCA. **Estimativa 2014 - Incidência do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro-RJ: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

- JIANG, P.; ZHANG, D. Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK): A Novel Regulator in Cell Cycle Control , Embryonic Development , and Cancer. p. 21551–21560, 2013.
- JØRGENSEN, H. F.; BEN-PORATH, I.; BIRD, A. P. Mbd1 Is Recruited to both Methylated and Nonmethylated CpGs via Distinct DNA Binding Domains. v. 24, n. 8, p. 3387–3395, 2004.
- JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. p. 206–222, 2011.
- KAINA, B. et al. MGMT : Key node in the battle against genotoxicity , carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. v. 6, p. 1079–1099, 2007.
- KANOKO, M. et al. Expression of ~ 53 protein in melanoma progression. v. 12, p. 97–103, 1996.
- KARAKOUSIS, G. C.; CZERNIECKI, B. J. Diagnosis of Melanoma. **PET Clinics**, v. 6, n. 1, p. 1–8, jan. 2011.
- KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 316–23, 18 nov. 2004.
- KEALEY, C. et al. A common insertion / deletion polymorphism of the thymidylate synthase (TYMS) gene is a determinant of red blood cell folate and homocysteine concentrations. p. 347–353, 2005.
- KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature genetics**, v. 27, n. 3, p. 247–54, mar. 2001.
- KIM, J. S. et al. Induction of apoptosis by ginsenoside Rk1 in SK-MEL-2-human melanoma. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 4, p. 717–22, mar. 2012.
- KO, J. M.; FISHER, D. E. A new era: melanoma genetics and therapeutics. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 241–50, jan. 2011.
- KONDO, E. et al. The Thymine DNA Glycosylase MBD4 Represses Transcription and Is Associated with Methylated p16 INK4a and hMLH1 Genes. v. 25, n. 11, p. 4388–4396, 2005.
- KOTOULA, V. et al. Expression of DNA repair and replication genes in non-small cell lung cancer (NSCLC): a role for thymidylate synthetase (TYMS). **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.
- KRETSCHMER, N. et al. Naphthoquinones from *Onosma paniculata* induce cell-cycle arrest and apoptosis in melanoma Cells. **Journal of natural products**, v. 75, n. 5, p. 865–9, 25 maio 2012.
- KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell death and differentiation**, v. 12 Suppl 2, p. 1463–7, nov. 2005.
- LAGET, S. et al. The Human Proteins MBD5 and MBD6 Associate with Heterochromatin but They Do Not Bind Methylated DNA. v. 5, n. 8, 2010.
- LIN, X. et al. A new cytotoxic sesquiterpene quinone produced by *Penicillium* sp. F00120 isolated from a deep sea sediment sample. **Marine drugs**, v. 10, n. 1, p. 106–15, jan. 2012.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.
- MAJNO, G.; JORIS, I. Review. v. 146, n. 1, p. 3–15, 1995.
- MARCHESI, F. et al. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 56, n. 4, p. 275–87, out. 2007.
- MARTÍ, R. M.; SOROLLA, A.; YERAMIAN, A. New Therapeutic Targets in Melanoma. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 103, n. 7, p. 579–590, set. 2012.
- MASSAOKA, M. H. et al. Jacaranone induces apoptosis in melanoma cells via ROS-mediated downregulation of Akt and p38 MAPK activation and displays antitumor activity in vivo. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38698, jan. 2012.
- MATTHEW G. VANDER HEIDEN, LEWIS C. CANTLEY, C. B. T. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 2010.
- MAYOLA, E. et al. Withaferin A induces apoptosis in human melanoma cells through generation of reactive oxygen species and down-regulation of Bcl-2. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 16, n. 10, p. 1014–27, out. 2011.
- MOLOGNONI, F. et al. Ras and Rac1 , Frequently Mutated in Melanomas , Are Activated by Superoxide Anion , Modulate Dnmt1 Level and Are Causally Related to Melanocyte Malignant Transformation. v. 8, n. 12, 2013.
- MONTENEGRO, R. C. et al. Cytotoxic activity of naphthoquinones with special emphasis on juglone and its 5-O-methyl derivative. **Chemico-biological interactions**, v. 184, n. 3, p. 439–48, 30 mar. 2010.
- MONTENEGRO, R. C. et al. Medicinal chemistry Biflorin , A Naphthoquinone , Inhibitsegfr in Breast Cancer Cells. v. 3, p. 179–182, 2013a.
- MONTENEGRO, R. C. et al. A novel o-naphthoquinone inhibits N-cadherin expression and blocks melanoma cell invasion via AKT signaling. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 27, n. 7, p. 2076–2083, 1 ago. 2013b.
- MULLER, P. A J.; VOUSDEN, K. H. P53 Mutations in Cancer. **Nature cell biology**, v. 15, n. 1, p. 2–8, jan. 2013.
- MUNIANDY, PARAMESWARY; LIU, JIA; MAJUMDAR, ALOKES; LIU, SU-TING; SEIDMAN, M. M. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. **Crit Rev Biochem Mol Biol.**, v. 45, n. 1, p. 23–49, 2011.
- N. P. SINGH, M. T. MCCOY, R. R. TICE, E. L. S. Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells '. v. 175, p. 184–191, 1988.
- NAG, R.; SMERDON, M. J. Altering the chromatin landscape for nucleotide excision repair. **Mutation research**, v. 682, n. 1, p. 13–20, 2009.

- NAKANO, I. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) regulates multipotent neural progenitor proliferation. v. 170, n. 3, p. 413–427, 2005.
- NAN, X. et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. v. 393, n. May, p. 386–389, 1998.
- NASCIMENTO, S. C. DO; MÉLLO, J. F. DE; CHIAPPETA, A. DE A. Agentes citotóxicos: experimentos com células KB. **Rev. Inst. Antibiot**, v. 22, n. 1/2, p. 19–26, 1985.
- NEVES, A. P. et al. Exploring the DNA binding/cleavage, cellular accumulation and topoisomerase inhibition of 2-hydroxy-3-(aminomethyl)-1,4-naphthoquinone Mannich bases and their platinum(II) complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 119, p. 54–64, fev. 2013.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v. 70, n. 3, p. 461–77, mar. 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311–35, 23 mar. 2012.
- O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 267, n. 17, p. 5421–6, set. 2000.
- 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. 2614–27, 15 dez. 2007.
- OLIVEIRA, C. S. et al. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 4, p. 824–33, 15 ago. 2011.
- OMHOLT, K. et al. NRAS and BRAF Mutations Arise Early during Melanoma Pathogenesis and Are Preserved throughout Tumor Progression NRAS and BRAF Mutations Arise Early during Melanoma Pathogenesis and Are Preserved throughout Tumor Progression. p. 6483–6488, 2003.
- PARRY, L.; CLARKE, A. R. The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer. p. 618–630, 2011.
- PATEL, P. M. et al. Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 47, n. 10, p. 1476–83, jul. 2011.
- PETRELLA, T. et al. Adjuvant interferon therapy for patients at high risk for recurrent melanoma: an updated systematic review and practice guideline. **Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))**, v. 24, n. 6, p. 413–23, ago. 2012.
- RAHMAN, L. et al. Thymidylate synthase as an oncogene : A novel role for an essential DNA synthesis enzyme. v. 5, n. April, p. 341–351, 2004.
- RAJASEKAR, S. et al. In vitro and in vivo anticancer effects of Lithospermum erythrorhizon extract on B16F10 murine melanoma. **Journal of ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 335–45, 21 nov. 2012.

- RODOLFO, M.; DANIOTTI, M.; VALLACCHI, V. Genetic progression of metastatic melanoma. **Cancer letters**, v. 214, n. 2, p. 133–47, 28 out. 2004.
- RODRIGUEZ, M.; SCHAPER, J. Apoptosis: measurement and technical issues. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 38, n. 1, p. 15–20, jan. 2005.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 722, n. 1-2, p. 225–54, 5 fev. 1999.
- SAITO, MOTOKI; ISHIKAWA, F. The mCpG-binding Domain of Human MBD3 Does Not Bind to mCpG but Interacts with NuRD / Mi2 Components The mCpG-binding Domain of Human MBD3 Does Not Bind to mCpG but Interacts with NuRD / Mi2 Components HDAC1 an. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. September 20, p. 434–439, 2002.
- SALUSTIANO, E. J. S. et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol , on human leukemic cells. v. 1, p. 139–144, 2010.
- SANTOS, M. T. DOS. **Prospecção de novos fármacos para melanoma em equivalente dérmico**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.
- SARASTE, A; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular research**, v. 45, n. 3, p. 528–37, fev. 2000.
- SEYMOUR, J. F. et al. Effects of azacitidine compared with conventional care regimens in elderly (≥ 75 years) patients with higher-risk myelodysplastic syndromes &. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 76, n. 3, p. 218–227, 2010.
- SGONC, R.; GRUBER, J. Apoptosis detection: an overview. **Experimental gerontology**, v. 33, n. 6, p. 525–33, set. 1998.
- SHEPHERD, C.; PUZANOV, I.; SOSMAN, J. A. B-Raf inhibitors: an evolving role in the therapy of malignant melanoma. **Current oncology reports**, v. 12, n. 3, p. 146–52, maio 2010.
- SHRIVASTAV, N.; LI, D.; ESSIGMANN, J. M. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 59–70, jan. 2010.
- SIEGEL, R. et al. Cancer Statistics , 2014. v. 64, n. 1, p. 9–29, 2014.
- SOLÍS-PAREDES, M. et al. Epigenetic modifications in cell lines of human astrocytoma differentially regulate expression of apoptotic genes. **Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery**, v. 30, n. 1, p. 123–9, jan. 2014.
- STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**, v. Appendix 3, p. Appendix 3B, maio 2001.
- SUNASSEE, S. N. et al. Cytotoxicity of lapachol , b -lapachone and related synthetic 1 , 4-naphthoquinones against oesophageal cancer cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 98–110, 2013.

- TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, jan. 2000.
- TREISMAN, J.; GARLIE, N. Systemic therapy for cutaneous melanoma. **Clinics in plastic surgery**, v. 37, n. 1, p. 127–46, jan. 2010.
- TSENG, C.-J. et al. Microtubule damaging agents induce apoptosis in HL 60 cells and G2/M cell cycle arrest in HT 29 cells. **Toxicology**, v. 175, n. 1-3, p. 123–42, 14 jun. 2002.
- TUDEK, B. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. **Molecular aspects of medicine**, v. 28, n. 3-4, p. 258–75, 2007.
- TUONG, W.; CHENG, L. S.; ARMSTRONG, A. W. Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. **Dermatologic clinics**, v. 30, n. 1, p. 113–24, ix, jan. 2012.
- URA, K.; HAYES, J. J. Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. v. 2293, n. May 2001, p. 2288–2293, 2002.
- VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. p. 151–159, 2005.
- VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 31, n. 4, p. 214–23, ago. 2002.
- VASCONCELLOS, M. C. et al. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 60, n. 5-6, p. 394–8, 2005.
- VASCONCELLOS, M. C. et al. Evaluation of the cytotoxic and antimutagenic effects of biflorin, an antitumor 1,4 o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 10, p. 799–810, out. 2010.
- VASCONCELLOS, M. C. et al. The in-vitro and in-vivo inhibitory activity of biflorin in melanoma. **Melanoma research**, v. 21, n. 2, p. 106–14, abr. 2011.
- VASCONCELLOS, M. C. D. V et al. Antitumor Activity of Biflorin , an o-Naphthoquinone Isolated from *Capraria biflora*. v. 30, n. 8, p. 1416–1421, 2007.
- VASCONCELLOS, MARNE C; MONTENEGRO, RAQUEL C.; MILITÃO, GARDÊNIA C. G.; FONSECA, ALUÍSIO M.; PESSOA, OTÍLIA D. L.; LEMOS, TELMA L. G.; PESSOA, CLÁUDIA; MORAES, MANOEL O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Bioactivity of Biflorin , a Typical o -Naphthoquinone Isolated from *Capraria biflora* L . **Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung**, p. 394–398, 2005.
- WANGARI-TALBOT, J.; CHEN, S. Genetics of melanoma. v. 3, n. January, p. 1–16, 2013.
- WELLBROCK, C.; HURLSTONE, A. BRAF as therapeutic target in melanoma. **Biochemical pharmacology**, v. 80, n. 5, p. 561–7, 1 set. 2010.
- WENTZEL, J. F. et al. Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay. **Analytical biochemistry**, v. 400, n. 2, p. 190–4, 15 maio 2010.
- WILSON, V. L. Carcinogenesis as the Sum of Its Parts. **Disruptive Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 110–115, jun. 2012.

- WISNIESKI, F. et al. Reference genes for quantitative RT-PCR data in gastric tissues and cell lines. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 19, n. 41, p. 7121–8, 7 nov. 2013.
- WITTINGHOFER, A.; SCHEFFZEK, K.; AHMADIAN, M. R. The interaction of Ras with GTPase-activating proteins. **FEBS Letters**, v. 410, n. 1, p. 63–67, jun. 1997.
- WOJEWÓDZKA, M.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 518, n. 1, p. 9–20, jun. 2002.
- WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 75–85, jul. 2005.
- WU, J. et al. Expression of an exogenous eukaryotic DNA methyltransferase gene induces transformation of NIH 3T3 cells. v. 90, n. October, p. 8891–8895, 1993.
- WU, Y.; KANTAKE, N.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Rad51 Protein Controls Rad52-mediated DNA Annealing *. 2008.